Série U - N°

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

FIXATION DES PRODUITS HORMONAUX THYROIDIENS PAR LE PLASMA ET LES LEUCOCYTES DE CHEVAL

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PAR

HELGA LOTZ

POUR OBTENIR LE TITRE
DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(MENTION PHARMACIE)

Soutenue le 5 Juillet 1962, devant la commission d'examen

MM. J. COURTOIS — Président
Y. RAOUL, F. PERCHERON — Examinateurs

Copies Circulaires — S. Vaillant, 2, rue du Sommerard, Paris v^e^

Série U - N°

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

FIXATION DES PRODUITS HORMONAUX THYROIDIENS PAR LE PLASMA ET LES LEUCOCYTES DE CHEVAL

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PAR

HELGA LOTZ

POUR OBTENIR LE TITRE
DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(MENTION PHARMACIE)

Soutenue le 5 Juillet 1962, devant la commission d'examen

MM. J. COURTOIS — Président
Y. RAOUL, F. PERCHERON — Examinateurs

Copies Circulaires — S. Vaillant, 2, rue du Sommerard, Paris v[e]

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM.	G. VALETTE	- Doyen, I
	M-M. JANOT	- Assesseur, I
	L. RODINEAU	- Secrétaire Général, I
	L. JEANDEL	- Secrétaire Général-Adjoint, I
Mme	S. CERTAIN	- Secrétaire, I
Mme	M.L. ESPINASSE	- Secrétaire, I
M.	G. FROISSARD	- Secrétaire

DOYEN HONORAIRE

M.	René FABRE	C , C, Membre de l'Institut

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.	René FABRE	C , C, Membre de l'Institut
	DELEPINE	C , I, Membre de l'Institut
	LAUNOY	O , I,
	FLEURY	O , I
	MASCRE	O , C
	PICON	O , I
	BEDEL	O , I

PROFESSEURS

MM.	M-M.JANOT	- I - Pharmacie Galénique (T)
	G. VALETTE	- I - Pharmacodynamie (T)
	R. PARIS	- I - Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale. (T)
	M. GUILLOT	- I - Physique (T)
	J. GAUTIER	- I - Chimie organique (T)
Mle	S. LAMBIN	- I - Microbiologie (T)
MM.	Y. RAOUL	- I - Physiologie
	J. COURTOIS	- I - Chimie biologique (T)
	L. DOMANGE	- I - Chimie Minérale (T)
	P. CRETE	- I - Botanique (T)
	R. TRUHAUT	O,I - Toxicologie et Hygiène industrielle (T)

MM.	A. MORETTE	- I -	Hydrologie (T)
	R. CAVIER	- I -	Parasitologie (T)
	A. QUEVAUVILLER	- I -	Hygiène et Education sanitaire
	R. MOREAU	- I -	Pharmacie chimique (T)
	J. GUY	- I -	Mathématiques appliquées aux Sciences physiques et biologiques (T.P.)
	A. GERMAN	- I -	Virologie et sérologie (T.P.)
	M. PIETTE	- I -	Biologie sanguine (T.P.).
	P. MALANGEAU	- A -	Chimie Analytique (T)
	M. GIRARD	- I -	Chimie appliquée à l'expertise (T)
	G. DILLEMANN	- -	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
	G. DEYSSON	- I -	Cytologie végétale (T.P.)
	J. FLAHAUT	- -	Minéralogie (T.P.)
	C. BOUDENE	- -	Professeur sans chaire
	A. LE HIR	- -	Professeur sans chaire
	J. RENAULT	- A -	Professeur sans chaire

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	Y. COHEN		- Sciences naturelles
	P. LARUELLE		- Physique
	G. LE MOAN		- Toxicologie
	P. ROSSIGNOL		- Pharmacodynamie
	H. RENAULT	A	- Pharmacie chimique
	C. PAOLETTI		- Sciences appliquées
	A. MANGEOT	A	- Chimie analytique
	P. DELAVEAU		- Biologie végétale
	P. REYNAUD		- Sciences physico-chimiques
	J. POISSON		- Sciences naturelles
	A. DESVIGNES	A	- Microbiologie
	F. PERCHERON		- Biochimie
	J. SAVEL		- Sciences naturelles
	J. BORY		- Sciences naturelles

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	P. BINET	- Parasitologie
	P. GESTEAU	I - Physique biologique
	J. GOUNELLE	- Analyse appliquée au contrôle des Médicaments (Section biologie)
	J. HARISPE	I - Chimie générale et pharmaceutique
	J. HENRY	- Chimie (4ème année)
Mme	J. HUBERT	- Microbiologie
MM.	R. LELUC	- Microbiologie
	M. LEMONNIER	- Chimie analytique (2ème et 3ème années)
Mlle	S. LONGUEVALLE	I - Service des examens de chimie
MM.	F. PELLERIN	- Chimie analytique (2ème et 3ème années)
	R. PERLES (F.F.)	- Chimie biologique
	J. PESTIS (F.F.)	- Biologie animale
	P. POULLAIN	- Hématologie
	J. RIVET (F.F.)	- Physique
Mme	M. ROBERT	- Sérologie
Mles	A. ROLLEN	A - Biologie végétale
	L. SEGUIN (F.F.)	- Analyse appliquée au contrôle des Médicaments (Section physico-chimique)
Mme	M. SEILLER (F.F.)	- Pharmacie galénique industrielle
M.	J. YONGER (F.F.)	- Chimie analytique (Ière année)

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M.	A. CAVE	- Chef de travaux de pharmacotechnie galénique
Mlle	H. MORIN	A - Chef de travaux de pharmacodynamie
M.	ROBBA	- Chef de travaux de pharmacotechnie chimique.

BIBLIOTHEQUE

Mles	Y. RUYSSEN	- Conservateur, chargée de la Direction
	LAVAUD	I - Conservateur
Mmes	DESGRIPPES	A - Bibliothécaire
	KREHMER	A - Bibliothécaire

Les recherches qui font l'objet de ce travail ont été réalisées au Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée du Collège de France, sous la direction de Monsieur le Professeur Jean ROCHE.

A mon Père

A ma Mère

A Monsieur le Recteur Jean ROCHE,

A Monsieur le Professeur Raymond MICHEL,
et à Madame Odette MICHEL,
Assistante au Collège de France.

A Messieurs les Professeurs de la Faculté
de Pharmacie de l'Université de Paris,
Membres de mon jury de thèse.

A mes Collègues et Amis du Laboratoire
de Biochimie Générale et Comparée du
Collège de France,

en profonde reconnaissance.

Ce travail a été réalisé grâce à la bourse qui
m'a été accordée par le Gouvernement Français.

I N T R O D U C T I O N G É N É R A L E

La synthèse des hormones thyroïdiennes s'opère au sein du corps thyroïde. L'iodure sanguin capté par la glande est oxydé en I_2 , lequel est rapidement incorporé sur une protéine spécifique pour former de la mono- et di-iodo-tyrosines qui, par condensation, conduisent à la formation de diverses iodothyronines dont les plus importantes sont la thyroxine et la 3,5,3'triiodothyronine. L'ensemble des produits iodés fait partie d'une protéine, la thyroglobuline. Celle-ci est hydrolysée par des cathepsines thyroïdiennes qui en libèrent les iodotyrosines et les iodothyronines. Les premières sont alors désiodées par une déshalogénase, l'iodure formé est réutilisé dans les réactions de la thyroxinogenèse. Les iodothyronines qui constituent les substances douées d'activité hormonale sont secrétées dans le sang, puis transportées aux récepteurs cellulaires où elles exercent leurs effets.

Le transport des hormones thyroïdiennes s'effectue grâce à la liaison qu'elles contractent avec certaines protéines plasmatiques dénommées TBP (thyroxine binding protein). T_4 forme avec celles-ci un complexe TBP-T_4 relativement stable qui est susceptible de se dissocier selon l'équilibre : $TBP\text{-}T_4 \rightleftharpoons TBP + T_4$.

La fraction protéique qui renferme les hormones thyroïdiennes se trouve dans le plasma de la plupart des espèces ani-

males (58, 63). Les oiseaux semblent en être dépourvus (81).

De nombreuses recherches ont illustré le rôle physiologique de la TBP. Actuellement on considère que la TBP non seulement sert au transport des hormones thyroïdiennes, mais qu'elle règle leur passage à l'intérieur des cellules.

- Le complexe TBP-T_4 ne peut pas franchir la paroi cellulaire en sorte que seule la T_4 provenant de la dissociation de ce complexe peut pénétrer dans les cellules.

Pour exercer leur action au niveau des récepteurs cellulaires les hormones thyroïdiennes doivent demeurer donc vraisemblablement à l'état libre; le complexe TBP-T_4 restant inactif. RALL et ROBBINS (63) ont montré qu'il existe une relation linéaire entre la T_4 libre et la déshalogénation. Or, la quantité d'hormone libre utilisable est indirectement proportionnelle à la teneur de la TBP plasmatique. On comprend dès lors que la pénétration cellulaire des hormones thyroïdiennes dépend de la constante d'équilibre entre la TBP , la T_4 et le complexe TBP-T_4 selon l'équation (79)

$$K = \frac{[TBP] \times [T_4]}{[TBP\ T_4]}$$

Le pouvoir fixant du sérum diffère avec la nature des divers acides aminés iodés. La T_4 possède la plus forte affinité pour la TBP par rapport aux autres dérivés iodés (78); T_3 est liée à la TBP de façon plus labile, environ cinq fois moins. Ces variations ont été rapprochées des différences des vitesses de pénétration intracellulaire des hormones thyroïdiennes. Des travaux ont été entrepris aussi bien in vivo qu'in vitro; c'est ainsi qu'on a ajouté à des coupes de tissus maintenues en survie soit les hormones thyroïdiennes libres, soit après avoir supplémenté le milieu avec du sérum ou une préparation de sérum enrichie en

TBP (14, 15, 24, 29, 31) - In vivo on a étudié leur répartition et leur vitesse de pénétration dans les différents espaces de l'organisme (65, 67). On constate la disparition rapide de T_3 du plasma accompagnée de sa pénétration dans les espaces extracellulaires; la disparition de T_4 du plasma vers le milieu interstitiel est également rapide. Mais en ce qui concerne la pénétration cellulaire la cinétique est très différente pour T_4 et T_3 . T_4 demeure longuement extracellulaire alors que T_3 pénètre dans les cellules cinq fois plus rapidement que T_4 , ensuite un équilibre dynamique intervient pour maintenir une concentration convenable entre les cellules et le milieu qui les entoure. La courbe de disparition sanguine des iodothyronines dépend donc en dehors de l'élimination urinaire et fécale, de leur captation cellulaire, celle-ci étant réglée par la libération de l'hormone à partir du complexe protéique qui la lie (50). Chez le poulet qui ne possède pas de TBP on peut prolonger de façon importante la demi-vie biologique de T_4 en supplémentant, avant l'injection, la solution de T_4 d'une préparation enrichie en TBP humaine (73). En outre, pendant la grossesse, où l'on observe une augmentation de la TBP, la demi-vie biologique de la radio- T_4 est prolongée (17). Les expériences in vitro ont été effectuées également sur les organes isolés et soumis à une perfusion continue au moyen de sang supplémenté en hormone marquée. On a montré que dans le rein (86) ou le foie isolé (6) les iodothyronines se distribuent comme chez l'animal in toto, c'est-à-dire qu'on trouve une diffusion intracellulaire rapide avec T_3 alors que T_4 demeure plus longuement extracellulaire.

En outre on a établi que la captation tissulaire est influencée par la présence de TBP ajoutée au milieu. FREINKEL (24) a montré que l'addition de sérum enrichi en TBP empêche la pénétration de la radiothyroxine dans des coupes d'organe : surrénales, coeur, ou foie. Ces résultats ont

été étendus par la suite au diaphragme du rat (14-15). Par contre si la TBP est saturée par l'enrichissement du sérum avec la thyroxine, la fraction libre, non liée à la TBP dyalisable de l'hormone, s'accroît et par conséquent , sa captation cellulaire augmente (34). On a également constaté in vitro comme in vivo une pénétration intracellulaire plus rapide avec T_3 qu'avec T_4 , ce qu'il convient de rapprocher du fait que T_3 possède une affinité plus faible pour la TBP sérique que T_4 (40).

L'existence d'une protéine tissulaire fixant la T_4 a été mise en évidence dans le diaphragme du rat (24-34) et caractérisée par électrophorèse sur papier (76). Néanmoins des incertitudes demeurent sur la nature et le rôle physiologique de la TBP cellulaire (TBPC). La capacité de cette protéine de fixer T_4 est inférieure à celle de la TBP sanguine. En effet, si l'on ajoute de petites quantités de sérum à un extrait de muscle de lapin qui contient de la radio-T_4 , on observe un passage de la radioactivité de la TBPC à la TBP du sérum (78). Par ailleurs, on doit se rappeler que la pénétration cellulaire des hormones thyroïdiennes n'est pas la même pour tous les organes, ce qui suggère l'hypothèse de l'existence d'un substrat protéique, fixant la T_4 , spécifique pour chaque type d'organe. Ainsi, on a constaté que le foie après injection de radio-T_4 concentre presque immédiatement près de 40 % de l'hormone marquée (50, 65, 67). Ce fait a été confirmé avec des coupes de foie maintenues en survie dans un milieu isotonique (42). L'importante concentration de l'hormone dans cet organe peut être rattachée à un système protéique intracellulaire ayant une affinité élevée pour T_4 . En effet, lorsqu'on injecte ^{131}INa , la radioactivité dans le foie est partagée entre les cellules et les liquides extracellulaires, tandis que T_4 s'accumule électivement dans le protoplasme (50).

L'existence des deux TBP règle le passage et la répartition de la T_4 entre le milieu interstitiel et les cellules. Enfin, le support protéique joue un rôle indirect dans l'action hormonale, ainsi que l'ont montré les recherches sur la désiodase tissulaire qui est inefficace sur la T_4 en présence de sérum enrichi en TBP (77) ou TBPC (43, 76, 77).

OBJET DU TRAVAIL :

De l'ensemble des travaux que nous avons exposés, il ressort que l'importance des deux types de TBP est considérable. Mais il apparaît qu'il n'a pas été possible jusqu'ici d'évaluer avec précision l'importance relative se référant aux recherches entreprises sur l'animal ou à celles portant sur les organes isolés.

L'emploi de coupes de tissu n'est pas pleinement valable car on ne peut en éliminer le sang en totalité. Dès lors, les travaux les plus significatifs sont ceux qui portent sur l'incorporation des hormones marquées dans les cellules isolées. Ainsi, on a démontré in vitro que T_4 et T_3 sont sélectivement fixées par E. coli, alors que ni les iodotyrosines ni les iodures ne le sont (68). La présence de sérum humain dans le milieu d'incubation a réduit la fixation des hormones thyroïdiennes par E. coli (13). La captation des hormones thyroïdiennes par les hématies humaines in vitro a été employée pour évaluer la fonction thyroïdienne (30, 31) car on remarque dans l'hyperthyroïdie une captation de T_4 , alors qu'elle est très faible dans les myxoedèmes. Cependant les bactéries qui ont un comportement différent des cellules tissulaires et les hématies qui sont anucléées et dont la respiration est très faible, ne peuvent pas fournir une réponse satisfaisante au rôle respectif joué

par les deux TBP dans la régulation hormonale. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes adressés aux leucocytes de cheval dont le métabolisme est intense et reproduit toutes les manifestations des cellules.

Par ailleurs, le plasma de cheval possède une TBP voisine de celle de l'homme (3, 4, 25, 54, 60). Les recherches que nous avons entreprises ont utilisé comme matériel de départ le sang de cheval. Dans une première étape, nous avons étudié la TBP plasmatique que nous avons essayé de concentrer et dans une deuxième, nous avons étudié la captation des produits hormonaux thyroïdiens radioactifs par les leucocytes en l'absence ou en présence de quantités variables de plasma.

Notre travail comporte donc deux parties :

Première partie :

Enrichissement de la TBP du plasma de cheval.

Deuxième partie :

Captation des iodothyronines et de leurs dérivés acétiques par les leucocytes de cheval.

P R E M I E R E P A R T I E

ENRICHISSEMENT DE LA TBP DU PLASMA DE CHEVAL

INTRODUCTION

La localisation des hormones thyroïdiennes sur les protéines sériques a été surtout établie grâce à des méthodes électrophorétiques (27, 35, 39, 62). Les premiers travaux ont mis en évidence par électrophorèse sur papier le fait que la T_4 migre surtout avec les α-globulines et ensuite avec la fraction albuminique (82). La position de T_4 a été mieux précisée, elle se situe entre les α_1 et α_2 globulines lorsque l'électrophorèse est réalisée à un pH 8,6 , en tampon véronal avec une force ionique n'excédant pas μ 0,1 (62). A côté des inter α_1-α_2-globulines, d'autres fractions protéiques du sérum semblent posséder la propriété de fixer T_4 . Ainsi, on a montré qu'en tampon tris(hydroxy-méthyl-amino-méthane) avec une force ionique élevée ($\mu = 0,2$) T_4,ajoutée au plasma humain,migre dans la zone inter α_1-α_2-globulines et dans la zone préalbuminique (37, 72). Cette dernière protéine a été nommée TBPA. La répartition de T_4 entre la fraction globulinique et les albumines a montré que les inter-α-globulines retiennent de préférence l'hormone, mais lorsqu'on ajoute au sérum des quantités croissantes de T_4 radioactive, on n'arrive pas à obtenir un seuil de fixation sur les α-globulines,

en raison d'une sorte de traînée d'albumines au niveau des globulines (58). Afin de pallier à cet inconvénient, on a mis au point une électrophorèse en zone inversée, grâce à laquelle on a pu établir que la capacité de fixation est de l'ordre de 20 µg/100 ml pour la TBP du sérum normal (59). Cette valeur est relativement élevée par rapport à celle de la thyroxinémie normale,5 µg/100 ml (63).

La nature de la TBP a été précisée par électrophorèse : à pH 4,5 elle se comporte comme les α_2-glycoprotéines (61, 70, 71), elle est chargée électronégativement et possède une mobilité électrophorétique de $1,7 \times 10^{-5}$ cm^2 vol^{-I} sec^{-I} pour un poids moléculaire de 40 000 - 50 000 , et une constante de sédimentation à l'ultracentrifugeuse de 3,3 unités Svedberg (56). L'analyse par électrophorèse dans divers solvants a donc montré que T_4 est liée au moins à trois protéines sériques : albumines, α-globulines et préalbumines. On peut se demander si les différentes protéines qui fixent T_4 résultent d'artefacts provoqués par les divers types d'électrophorèse ou bien s'il s'agit de fragments dissociés d'un complexe protéique unique, pendant l'électrophorèse.

Dans le but de préciser ces éventualités, des fractionnements protéiques ont été entrepris, ils ont été conduits en général à partir des protéines sériques séparées selon COHN (11). On a montré que toutes les fractions contiennent de l'iode, mais que le rapport iode/azote le plus élevé est localisé dans la fraction IV (69, 83) et VI-3 (70).

Par la suite, FREINKEL (23) a montré que toutes les fractions qui précipitent après celle désignée par III ont une grande capacité de fixation de T_4 et que les sub-fractions IV-6 et IV-9 de caractère acide sont les plus puissantes. Elles renferment vraisemblablement la plus forte teneur en TBP , aussi ont-elles été utilisées comme matière première pour les essais de purification (38). La chromatographie

échangeuse d'ions sur résine Dowex I équilibrée avec un tampon acide acétique / acétate de Na permet une bonne séparation de la TBP du complexe protéique de la fraction IV-6 de COHN. Cependant cette technique a été abandonnée car la TBP obtenue a perdu plus ou moins son pouvoir fixant. Des expériences ont été réalisées avec la fraction IV-4 de COHN laquelle a été traitée par $SO_4(NH_4)_2$, puis le précipité obtenu passé sur D E A E (diethyl-amino-éthyl cellulose). Les éluats renferment deux protéines : la TBP et une α_2-glycoprotéine ne fixant pas T_4. On a caractérisé ensuite une troisième protéine, TBPA, ayant une forte avidité pour T_4, qui migre avec les préalbumines (36) en différents systèmes électrophorétiques. Celle-ci a été partiellement purifiée par électrophorèse sur colonne à partir du sérum humain (80).

Plus récemment, à l'aide de plusieurs systèmes chromatographiques et électrophorétiques en différents milieux on a pu purifier à partir de la fraction IV-9 de COHN une TBP unique dont l'homogénéité est démontrée par l'immuno-électrophorèse et l'ultracentrifugation (80). L'enrichissement de la TBP plasmatique à partir de la fraction IV de COHN ne saurait nous faire oublier que toutes les fractions retiennent la T_4, seule leur capacité de fixation est plus faible. On peut dès lors se demander si la TBP caractérisée sur la fraction IV-6 n'est pas particulière à cette fraction et, par conséquent, si les autres constituants protéiques ne renferment pas des TBP différentes. Par ailleurs, il faut tenir compte du fait que la méthode de COHN, qui comporte l'utilisation d'un sel de zinc et l'obtention des protéines à l'état sec, est susceptible de provoquer la dénaturation des protéines sériques, comme l'a établi DERRIEN (thèse de Sciences) et TONG (84).

Aussi, ne peut-on exclure tout-à-fait que ces

constituants qui diffèrent des protéines natives par leurs groupements libres, n'acquièrent pas la propriété de complexer plus ou moins intensément la T_4 .

Ces raisons multiples nous ont amenés à rechercher une méthode différente pour concentrer la TBP plasmatique.

Nous nous sommes servis de la méthode de précipitation par les solutions salines concentrées en utilisant comme sel relargant le sulfate d'ammonium. Nous avons suivi le fractionnement par électrophorèse et nous avons repéré la zone protéique, qui fixe la thyroxine, en comparant les protéinogrammes à la migration de la thyroxine marquée. Ces recherches nous ont imposé la réalisation de techniques analytiques diverses, électrophorétiques, et radioautographiques entre autres, ainsi que la préparation des produits radioactifs.

Nous exposerons d'abord les méthodes expérimentales que nous avons utilisées dans nos études, puis nous présenterons les essais de concentration de la TBP plasmatique.

I - MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.-

Nous présenterons en premier lieu les conditions analytiques et la préparation des hormones thyroïdiennes marquées par ^{131}I, utilisées au cours de la première partie de ce travail. Nous ne les répéterons pas lorsque nous les retrouverons dans les études sur les leucocytes.

Pour désigner les iodothyronines, nous avons adopté les abréviations ou symboles énumérés ci-dessous et établis d'après les bases de la nomenclature officielle (33).

3,5,3',5'-tetraiodo-L-thyronine : T_4

3,5,3'-triiodo-L-thyronine : T_3

3,5-diiodo-L-thyronine : T_2

1.- Mesures de la radioactivité et autoradiographies.-

Grâce à l'emploi des hormones thyroïdiennes marquées par ^{131}I, l'ensemble de nos recherches a pu être réalisé dans les conditions qui sont décrites par la suite. Les mesures de la radioactivité nécessaires pour nos expériences ainsi que les autoradiographies sont précisées ci-dessous :

^{131}I émet des β^- de 0,6 MeV et des γ de 0,37 - 0,08 MeV. La radioactivité sur échantillon liquide a été déterminée avec un compteur à scintillations à cristal cristal creux de INa activé au TL (Tracerlab). Celle de ^{131}I sur échantillon sec ou sur papier a été mesurée avec un compteur de Geiger-Müller à fenêtre de mica de 2 mg/cm^2.

Les autoradiographies des chromatogrammes et des ionophorégrammes ont été établies par leur mise au contact avec des films radiologiques Kodak Kodirex (sans écran et émulsionnés sur les deux faces) pendant une durée fonction de la radioactivité totale du produit analysé et du nombre possible des constituants, sachant qu'une irradiation totale correspondant à 10^6 impulsions au compteur Geiger-Müller par 1 cm^2 fournit un noircissement suffisant à la révélation du film. De manière à pouvoir déterminer exactement la position du film sur le papier à analyser, on a coupé des petits coins dans le film, pour pouvoir bien faire coïncider film et papier après révélation. Les radioélectrophorégrammes ont été établis par mesure de la radioactivité centimètre par centimètre (fenêtre de 1 x 3 cm) avec un compteur de Geiger-Müller.

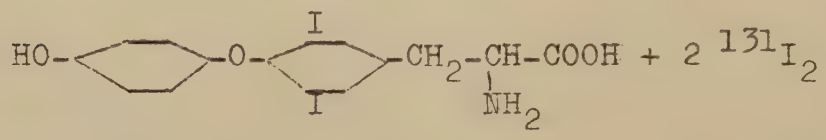
2.- Préparation des hormones thyroïdiennes marquées par ^{131}I.-

La préparation des iodothyronines marquées a été conduite selon un mode opératoire antérieurement décrit (64) par iodation de la 3,5-diiodo-L-thyronine (3,5 T_2) en milieu

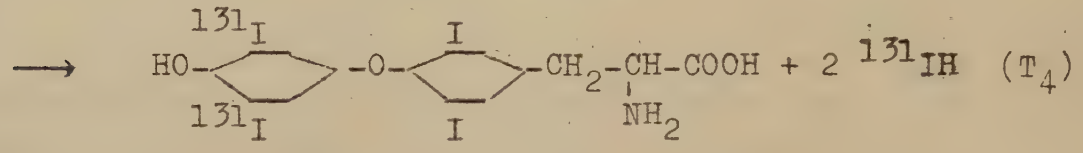
ammoniacal. Des modifications de détail ont néanmoins été apportées à la technique originale dont le principe repose d'une part, sur une réaction d'échange (1) en milieu acide entre ^{131}INa (sans entraîneur) et $^{127}I_2$ et d'autre part sur la substitution préférentielle des hydrogènes en position ortho (2) par rapport à l'hydroxyle phénolique de la thyronine. Ces réactions peuvent s'écrire comme suit :

(1) $2\ ^{131}INa + {}^{127}I_2 \rightleftharpoons 2\ ^{127}INa + {}^{131}I_2$

(2) a)

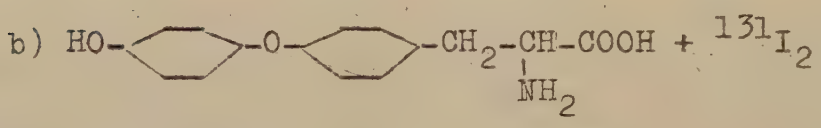


$+ 2\ ^{131}I_2$

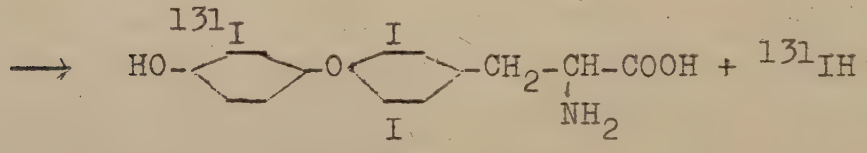


$+ 2\ ^{131}IH$ (T_4)

b)



$+ {}^{131}I_2$



$+ {}^{131}IH$ (T_3)

Le mode opératoire adopté est le suivant :

a) Préparation du matériel : Trois micropipettes en verre effilé jaugées à 10,50 et 50 µl sont fabriquées ainsi que deux microagitateurs. L'aspiration dans ces pipettes est obtenue au moyen d'une micropompe. Deux tubes en verre pyrex de petite dimension sont également nécessaires (2 mm. de diamètre et 25 mm de haut). Les manipulations des produits radioactifs s'effectuent sous hotte en prenant toutes les mesures de radioprotection indispensables.

b) Préparation des solutions : quelques heures à l'avance, on prélève la quantité voulue de la solution mère de ^{131}INa sans entraîneur (provenant du Centre atomique de Saclay), qui renferme habituellement 50 mC en solution dans 1 ml d'H_2O légèrement sodique (pH = 8,5). La prise d'essai est déposée dans un des deux petits tubes (tube 1) préalablement taré et ensuite placé sous P_2O_5 et concentré sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'un résidu sec dont le poids est déterminé. Ce résidu est essentiellement constitué par du carbonate de Na. On prépare une solution SO_4H_2 3N et au moment de la synthèse, une solution alcoolique de $^{127}I_2$ (100 mg dans 50 ml d'éthanol absolu) ainsi qu'une solution ammoniacale de 3,5 T_2 (Glaxo Laboratories Middlesex) renfermant 2 mg dans 1 ml de NH_4OH concentré (d = 0,85).

c) Iodation de 3,5-T_2 : Le résidu contenant ^{131}INa est repris par 10 µl SO_4H_2 3N de manière à obtenir une solution acide de pH = 4-5, favorable à la réaction d'échange avec $^{127}I_2$.

A cette solution acide de ^{131}INa on ajoute 50 µl de la solution alcoolique de $^{127}I_2$ (soit 100 µg d'iode) et on mélange soigneusement au moyen du microagitateur: Dans le second microtube (tube 2) on verse 50 µl de la solution ammoniacale de 3,5 T_2(100 µg) et le tube, muni d'un support, est placé dans un cristallisoir et entouré de glace pilée. La micro-pipette ayant servi à prélever la solution d'iode est utilisée pour verser goutte à goutte la solution d'iode radioactif dans le tube 2, contenant la diiodothyronine. Cette opération est effectuée lentement et sous agitation. L'iodation de T_2 se manifeste par une décoloration régulière de la solution iodée. L'opération terminée le contenu du tube 2 de synthèse est en totalité transvasé dans le tube 1. Les deux tubes sont placés dans la glace et

laissés au repos pendant une demi-heure.
La formation de T_4 et de T_3 marquées est en fonction de la quantité d'iode I^{127} ajoutée. Nous avons constaté que la meilleure proportion pour obtenir T_4 et T_3 en proportions presque égales est 100 µg I^{127}/50 µl pour les quantités indiquées ci-dessus.

d) Séparation des produits de la réaction : La séparation des produits de synthèse s'effectue en deux étapes. La première élimine les iodures radioactifs et la seconde sépare les iodothyronines marquées. Dans ce but, le contenu des tubes 1 et 2 est déposé le long d'une ligne de 15 cm sur papier Whatman n° 1 destiné à une électrophorèse préparative. Les tubes sont lavés soigneusement à trois reprises par 50 à 100 µl de NH_4OH concentré et la solution de lavage est elle-même déposée sur le papier.
L'électrophorèse est effectuée dans les conditions suivantes, réalisant une bonne séparation entre les iodures qui migrent de 5 à 10 cm vers l'anode et les iodothyronines qui demeurent à l'origine : tampon carbonate-acétate à pH 8,2 , (CO_3 $(NH_4)_2$ 0,05 M 2 litres, acide acétique 0,2 M 320 ml , H_2O 980 ml) 2 heures sous 300 volts et 12 mA pour un papier de 28 cm de large et 42 cm de long. Le papier d'ionophorèse est séché sous hotte et placé trois minutes au contact d'un film radiographique (Kodak-Kodirex sans écran) qu'on révèle. Cette autoradiographie permet de découper exactement la bande de l'ionophorégramme correspondant aux iodothyronines. Celles-ci sont éluées pendant 18 heures par du n-butanol saturé d'eau (dans ces conditions on élue 70-80% des corps marqués). Les produits de cette opération sont alors soumis à une chromatographie en phase descendante en n-butanol saturé par NH_4OH 2 N . Un autoradiogramme est réalisé par mise en contact du chromatogramme avec

un film radiographique pendant 3 minutes. Il montre 3 bandes principales : l'une au R_F des iodures, l'autre au R_F de la thyroxine et la troisième correspondante à T_3 . L'évolution en n-butanol saturé d'eau est effectuée sur de petites bandes découpées du chromatogramme au plus tard un jour avant l'expérience. Ce procédé nous a permis d'employer des hormones marquées fraîchement préparées renfermant moins de 10% d'iodures. Leur pureté a été vérifiée par une autoradiochromatographie sur des prises d'essai de 10 000 impulsions/minute au Geiger (fenêtre de mica de 2 mg/cm^2).

e) Activité spécifique : l'activité spécifique µC par µg T_4(T_3) est établie de la manière suivante :

$$1\ \mu g\ T_4 = \frac{^{131}I}{^{127}I} \times 0{,}326$$

$$1\ \mu g\ T_3 = \frac{^{131}I}{^{127}I} \times 0{,}195$$

^{131}I est la quantité d'iode radioactif utilisé et exprimé en µC , ^{127}I celle de l'iode en µg. 0,326 = le poids atomique des deux atomes d'iode fixé par T_2 , divisé par le poids moléculaire de T_4 . 0,195 = le poids atomique de l'iode fixé par T_2 , divisé par le poids moléculaire de T_3 .

Les activités spécifiques ainsi obtenues variaient d'une synthèse à l'autre de 25 à 59 µC/µg T_4 . Elles nous ont permis de réaliser nos expériences avec des quantités très faibles d'hormone marquée, c'est-à-dire physiologiques, ce qui était indispensable pour nos recherches (15 à 35 µC/µg T_3).

3.- Dosage des protéines.-

Les solutions protéiques ont été dosées soit par

KJELDAHL, soit par colorimétrie après réaction du biuret suivant la technique de FLEURY et COURTOIS (21) ou soit encore par spectrophotométrie différentielle selon WADDELL. Cette dernière méthode, qui est une application de la technique préconisée par MURPHY et KIES (52) consiste à mesurer l'absorption de la solution protéique à deux longueurs d'ondes, 215 mμ et 225 mμ.

Le résidu protéique est dissous dans 0,1 ml de NaOH N , on porte 2 à 3 minutes à 60° environ afin d'obtenir la dissolution totale et on complète à 1 ml par de l'eau distillée. 0,1 ml de cette solution est diluée à 10 ml par l'eau distillée. Dans ces conditions la concentration protéique est de l'ordre de 50 μg par ml. L'absorption de cette solution est mesurée à 215 mμ et 225 mμ au spectrophotomètre BECKMAN dans une cuve en quartz de 1 cm, en utilisant comme cuve compensatrice une solution de NaOH 0,001 N. La différence Δ entre les deux absorptions aux 2 longueurs d'ondes est proportionnelle à la quantité de protéines comprise entre 10 et 50 μg par ml. Une courbe d'étalonnage est pratiquée à partir de solutions de sérum-albumine humaine dans la soude 0,001 N. La figure 1 représente les variations de différence d'absorption en fonction de la concentration protéique en μg/ml.

L'erreur est au maximum $\pm$ 6%.

Les avantages de cette méthode sont multiples. D'abord elle est de 10 à 20 fois plus sensible que la méthode au biuret; elle dépend comme celle-ci des liaisons CO - NH et, par conséquent, n'est pas fonction de la richesse des protéines en tel ou tel acide aminé.

Parmi les autres techniques sensibles préconisées, il en est une qui consiste à déterminer l'absorption des acides aminés aromatiques en se plaçant à une longueur d'onde de 260 à 280 mμ (88) ou encore en utilisant la réac-

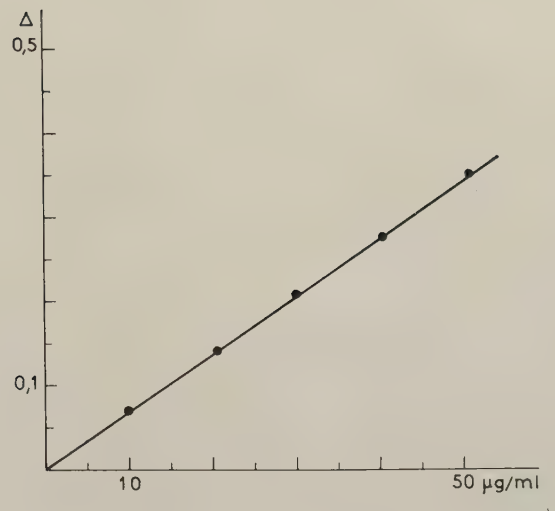


Figure 1

Variations des différences entre les densités optiques déterminées à 215 et 225 mµ (ordonnées) en fonction de quantités croissantes de sérum-albumine humaine exprimées en µg/ml (abscisses).

tion de FOLIN et CIOCALTEU (22) qui est fonction de la teneur en tyrosine et en cystéine.

Nous avons tenu à vérifier que la méthode de MURPHY et KIES ne s'appliquait qu'à la détermination des CO-NH , et non à certains acides aminés. Dans ce but nous avons étudié la différence Δ entre les 2 absorptions 215 et 225 mμ avec des solutions de divers peptides : anhydride de glycine , L- leucyl-L- tyrosine à des concentrations de 10 - 20 - 30 - 40 μg par ml. Avec tous les peptides Δ est linéaire et la pente est la même lorsqu'on porte en abscisses la concentration en azote peptidique par ml. Cette pente correspond à celle de concentration protéique lorsqu'on la rapporte à l'azote protéique par ml.

Un autre avantage est que les solutions protéiques renfermant du sulfate d'ammonium peuvent être dosées directement sans être préalablement dialysées, ce qui nous a permis d'utiliser cette méthode pour nos études sur l'enrichissement de la TBP plasmatique.

4.- Protéinogrammes et électroautoradiogrammes.-

Le plasma et les produits de fractionnements sont analysés par électrophorèse sur papier. Elles ont été pratiquées dans une cuve horizontale, avec un appareil ELPHOR. Le tampon est généralement constitué par du véronal sodique 0,06 M à pH 8,6. La préparation de ce tampon est obtenue en dissolvant 9,8 g de véronal sodique, 6,84 g d'acétate de sodium cristallisé dans 900 ml environ d'eau distillée; on ajoute ensuite lentement et avec précaution 60 ml environ HCl 0,1 N de façon à obtenir un pH de 8,4 , on complète à un litre avec de l'eau distillée.

Les prises d'essai de protéines sont comprises entre 0,1 à 0,7 mg sous un volume de 10 à 20 μl , et dépo-

sées sur une bande de 4 cm de papier (SCHLEICHER-SCHÜLL n° 2043 a MgI). L'électrophorèse est en général conduite pendant 15 heures sous intensité constante de 0,3 mA par cm de papier. La tension de départ est comprise entre 110-130 Volts. Les bandes séchées, les protéines sont révélées au moyen de vert sulfo. La solution du colorant renferme 0,5 g de vert sulfo , 45 ml d'éthanol absolu, 5 ml d'acide acétique cristallisable, complété à 100 ml par de l'eau distillée. Les bandes sont entièrement recouvertes par cette solution et laissées en contact pendant 10 minutes, puis l'excès de réactif est éliminé par des lavages répétés au moyen d'acide acétique 2% . Les protéines apparaissent en vert foncé sur fond blanc.

La plupart de nos travaux ont comporté,en outre, l'étude de la migration de la thyroxine radioactive en présence de protéines. La T_4 marquée, conservée sur les chromatogrammes préparatifs est éluée au moment de l'emploi par du n-butanol saturé d'eau. La solution butanolique est évaporée sous courant d'azote dans un microtube; le résidu sec renferme habituellement de 0,002 à 0,005 µg T_4 . On ajoute alors 0,1 ml de la solution protéique et on agite avec précaution longuement pour solubiliser complètement la T_4 .

10 ml de cette solution contenant une radioactivité de 1000 à 10 000 impulsions par minute (compteur Geiger-Müller 2 mg/cm^2) sont soumis à électrophorèse comme précédemment indiqué. Dans ce cas, les essais sont pratiqués en double : sur l'un les protéines sont révélées au vert sulfo, sur l'autre la radioactivité est, soit comptée au moyen d'un compteur Geiger-Müller tout le long de l'électrophorèse, soit repérée par radioautographie au moyen d'un film sensible.

A titre d'exemple sont présentés les documents obtenus après addition de 0,03 µg de T_4 à 1 ml de plasma (Fig.2 : A1, B1).

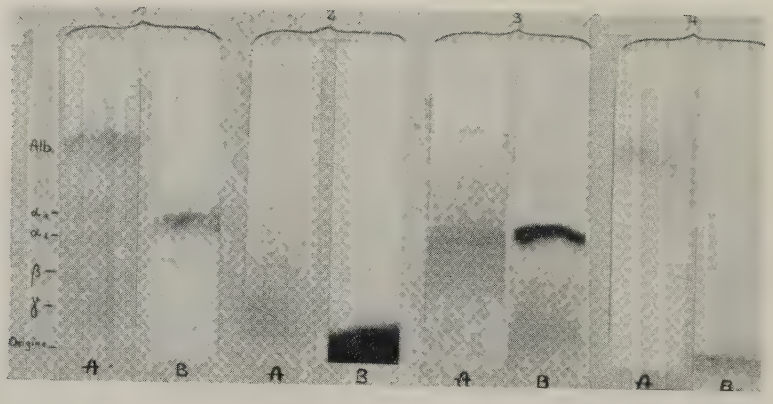


Figure 2

A : électrophorégrammes révélés au vert brillant.
Alb = albumines α_1 - α_2 - β - γ - globulines.

B : radioélectrophorégrammes.
1 = plasma de cheval
2 = protéines plasmatiques précipitant à 45% (P_{45})
3 = protéines plasmatiques précipitant entre 45 et 50% (P_{45-50})
4 = protéines plasmatiques restant solubles à 50 % (S_{50}).

II.- FRACTIONNEMENTS DES PROTÉINES PLASMATIQUES DE CHEVAL

Le plasma de cheval est soumis à divers fractionnements au moyen de solutions saturées de sulfate d'ammonium. Les protéines séparées, additionnées de thyroxine marquée par ^{131}I , sont analysées par électrophorèse et la migration de l'hormone est repérée par détermination de la radioactivité.

1.- Séparation du plasma.-

Chaque préparation est effectuée à partir de 4 fois 1 litre de sang de cheval. Après section carotidienne le sang est recueilli dans des flacons en polythène afin d'éviter l'hémolyse; chaque récipient d'un litre renferme soit 0,2 ml de liquemine (1 mille U.I.), soit 100 mg d'héparine cristallisé (114 U.I. par mg) (UCLAF Hoffmann Laroche). Il est transporté immédiatement au laboratoire et traité moins d'une heure après son prélèvement. Avant la centrifugation on mélange bien chaque flacon, ensuite on les centrifuge pendant 10 minutes à 2 500 tours (centrifugeuse Jouan 4 l.). Le plasma est prélevé avec précaution par opération sous vide à l'aide d'un tube de verre effilé. Le volume plasmatique est compris entre 1,8 l. et 2,4 l.
L'électrophorèse du plasma montre que la TBP se situe comme chez l'homme entre les α_1 et α_2 globulines (Fig. 2 : B 1).

2.- Fractionnement du plasma.-

Divers fractionnements sont pratiqués, le premier comporte la séparation des protéines précipitant à une concentration en sulfate d'ammonium de 45 % de la saturation en sel, (condition : température constante de 24°C), puis des pro-

téines précipitant entre 45 % et 50 % et enfin celles solubles à 50 %. Dans tous les cas, le sel relargant utilisé est constitué par une solution de sulfate d'ammonium saturée à 20°. Le volume V en ml de cette solution, à ajouter au volume v d'une solution protéique de concentration saline S_1 (exprimée en pour cent) laquelle doit être amenée à une concentration saline S_2 (exprimée en pour cent) est donné par la formule :

$$V = \frac{v(S_2-S_1)}{100 - S_2}$$

A.- Précipitation à 45% -

Le plasma de cheval renferme de 70 à 80 g de protéines par litre. La précipitation est effectuée sur le plasma non dilué, par addition d'une solution saturée en sulfate d'ammonium. La concentration protéique finale est environ 4,5 mg par ml. On ajoute au plasma le volume calculé de la solution saturée au sulfate d'ammonium par petites quantités et lentement en mélangeant avec précaution afin d'éviter toute formation de mousse. On place ensuite dans un bain-marie à 24° pendant 15 heures. Le précipité est séparé par centrifugation et le surnageant recueilli quantitativement. - Nous désignerons le précipité après dissolution dans le moins d'eau possible par P_{45} , le surnageant par S_{45} .

Une partie aliquote de P_{45} est dialysée et l'azote protéique déterminé par KJELDAHL. Les électrophorèses sont pratiquées soit avec le produit dialysé, soit avec P_{45} lui-même. Le protéinogramme de P_{45} (Fig. 2 : A2) montre qu'il est constitué essentiellement de β- et γ-globulines. La thyroxine ajoutée à dose traceuse à P_{45} dialysé ou non, demeure à l'origine des électrophorégrammes (Fig.2 : B2) ce qui montre que l'hormone demeure à l'état libre. La quan-

tité de protéines correspond à 20 mg environ par ml de solution.

B.- Précipitation à 45 - 50 % -

Le surnageant S_{45} renferme la totalité des albumines et les α-globulines. La concentration protéique du milieu est de 33 g/l.

La solution de sulfate d'ammonium est ajoutée à S_{45} , comme indiqué précédemment, pour amener la concentration saline à 50 %. Le précipité est recueilli quantitativement par centrifugation et dissous dans le moins d'eau possible. Les électrophorèses sont réalisées sur cette solution et le dosage protéique établi par la méthode au biuret et par celle de MURPHY et KIES (52) comme décrit précédemment, le sulfate d'ammoniaque n'interférant pas. Les analyses du surnageant à 50 % (S_{50}) sont effectuées sur le produit tel quel. Les protéinogrammes et les radioélectrophorégrammes après addition de T_4 marquée à P_{45-50} et S_{50} sont représentés sur la figure 2 (A3 , B3; A4, B4). Le protéinogramme de P_{45-50} est surtout constitué par des α-globulines, accompagnés par des traces d'albumines et de β-globulines. La T_4 migre en totalité, et occupe la même position que dans le plasma initial, c'est-à-dire entre les α_1- et α_2-globulines.

Le surnageant S_{50} qui contient la totalité des albumines ne renferme pas de TBP car la thyroxine demeure en général à l'origine de l'électrophorégramme. (Fig. 2 : B4).

Nous avons observé des variations individuelles assez sensibles selon les échantillons dans la composition du plasma de cheval. La proportion des γ-globulines est plus élevée que dans le sang humain. Le fractionnement est toujours réalisé dans des conditions identiques, mais ce-

pendant la composition de P_{45} présente des différences. Parfois on observe encore des β-globulines, tandis que, assez souvent, l'élimination des albumines n'est pas complète. Néanmoins, nous pouvons considérer que la TBP est située dans tous nos fractionnements sur les constituants protéiques qui précipitent entre 45-50 % . Aussi avons-nous utilisé pour les fractionnements ultérieurs, dans le but d'enrichir encore davantage en TBP, cette fraction protéique.

3.- Fractionnements de P_{45-50} :-

Nous avons réuni les solutions de P_{45-50} qui sont d'une coloration bleu-vert intense, laquelle est due à la présence du caeruloplasmine, une protéine renfermant du cuivre. Ces solutions proviennent de 20 préparations différentes obtenues chacune d'entre elles à partir de 4 litres de sang de cheval. Le mélange final est dialysé d'abord à l'eau courante, puis à l'eau distillée. La solution dialysée que nous continuerons à désigner sous le terme P_{45-50} , renferme 50 mg/ml pour un volume total de 650 ml. C'est à partir de P_{45-50} qu'ont été effectués des fractionnements dans des limites étroites de concentration saline.

Le fractionnement a débuté à 44 % en dépit du fait que le précédent avait été conduit à 45 %. Une seule séparation ne parvient jamais à réaliser une séparation totale des constituants protéiques. On a établi que dans un mélange de protéines le constituant le moins soluble n'est pas entièrement précipité, alors que le plus soluble a déjà commencé à insolubiliser.

Les protéinogrammes obtenus sur les fractions 0-44 % (P'_{44}) et les radioautogrammes (Fig. 3 : A2 , B2) correspondant montrent que les γ-globulines et une frac-

tion des β-globulines ont été éliminées à cette concentration saline. La T_4 , ajoutée à une concentration de 0,1 µg par ml de solution protéique, fixée sur la TBP, ne représente que 5 % de la radioactivité fixée par la TBP des fractions 47-50 et 50-54. Aussi avons-nous été conduits à ne pas pousser plus avant le fractionnement de P'_{44} , lequel contient néanmoins près de 25 % des protéines totales du mélange P_{45-50} . Les opérations ont porté sur le surnageant à 44 % (S'_{44}). La fraction 44-47 % est peu différente de la précédente et la quantité de T_4 retenue par mg de protéine est de 0,0007 µg.

Le surnageant S'_{47} est précipité à 50 %. Enfin le surnageant S'_{50} est amené à 54 %. Les fractions les plus riches en TBP sont ces deux dernières fractions, c'est-à-dire P'_{47-50} et P'_{50-54} . P'_{47-50} renferme surtout des α-globulines , les β ayant été pratiquement éliminées. Cependant la fraction P'_{50-54} qui est la plus riche en TBP renferme des traces d'albumines. En effet, le protéinogramme montre qu'à côté de celles-ci le produit principal est constitué par les α_1-globulines et par des protéines situées entre les α_1- et α_2-globulines. Les constituants inter-α qui n'apparaissaient pas sur le plasma non fractionné,parce qu'en trop faibles quantités,occupent la position de la TBP.

Il peut sembler paradoxal que ce soit à partir d'un mélange protéique 45-50 % que l'on sépare une partie précipitant entre 50-54 % et que ce soit sur celle-ci que se trouve la concentration la plus élevée en TBP. Ce fait résulte, d'une part des différences de concentration protéique entre le fractionnement 45-50 , dont la teneur finale en protéines est de 50 mg/ml et celui entre 50-54 , qui est opéré dans un milieu à 12,8 mg/ml; d'autre part il convient de noter que le précipité à 50 % renferme des albumines qui sont pourtant plus solubles et qui, néanmoins , ont été entraînées au cours de la précipitation.

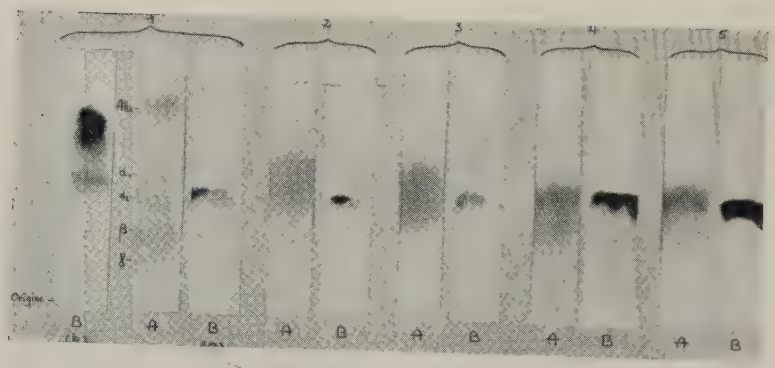


Figure 3

A : électrophorégrammes révélés au vert brillant.
Alb = albumines α_1 - α_2 - β - γ - globulines.

B : radioélectrophorégrammes.
1 = plasma de cheval : (a) 0,00125 T_4/mg protéine
(b) 0,008 T_4/mg protéine

2 = protéines de la fraction P_{45-50}, précipitant à 44 % après dialyse (P'44).

3 = protéines de la fraction P_{45-50}, précipitant entre 44 et 47 % (P'44-47).

4 = protéines de la fraction P_{45-50}, précipitant entre 47 et 50 % (P'47-50).

5 = protéines de la fraction P_{45-50}, précipitant entre 50 et 54 % (P'50-54).

Résultats :

Afin de pouvoir suivre l'enrichissement en TBP au cours des divers fractionnements, nous résumerons sur deux tableaux les opérations que nous venons d'exposer, en indiquant chaque fois la quantité de protéines recueillies, en indiquant pour le fractionnement brut P_{45-50} les rendements obtenus à partir d'un litre de plasma (Tableau I). Pour les fractionnements plus fins les résultats obtenus seront rapportés à la totalité des 650 ml des P_{45-50}, renfermant 33 g de protéines provenant du fractionnement de 33 litres de plasma (Tableau I^{bis}).

Tableau I

Caractéristiques des fractions obtenues à partir du plasma de cheval.

Concentration saline en % de la saturation	Concentration protéique finale du mélange	Quantité de protéines recueillies en g/l plasma	Quantité maximum de T_4 fixée sur la TBP : en µg T_4/mg de protéine.
45	41,5 mg/ml	40,2 g/l	0
45-50	31,7 mg/ml	0,98 g/l	0,007 µg/mg
50	32,2 mg/ml	32,2 g/l	0

Tableau I^{bis}

Caractéristiques des fractions obtenues à partir de la fraction enrichie en TBP : P_{45-50}

Concentration saline en % de la saturation	Concentration finale du mélange	Quantité de protéines en g recueillies à partir des 650 ml de P_{45-50}	Quantité maximum de T_4 fixée sur la TBP : en µg T_4/mg de protéine
44	29 mg/ml	7,9 g/650 ml	0,0006 µg/mg
44-47	23,5 mg/ml	6,0 g/650 ml	0,0007 µg/mg
47-50	17,8 mg/ml	5,0 g/650 ml	0,07 µg/mg
50-54	12,8 mg/ml	4,8 g/650 ml	0,075 µg/mg
54	11 mg/ml	7,2 g/650 ml	-

On peut estimer que P'_{47-50} et P'_{50-54} peuvent fixer au moins 0,075 µg T_4/mg de protéines, alors que le plasma de cheval retient au plus 0,00125 µg T_4/mg de protéines plasmatiques totales. Pour une teneur plus élevée, ce sont les albumines qui la fixent alors (Fig. 3. B1b). Nous avons donc réalisé un enrichissement d'au moins 60 fois.

Discussion -

Le plasma de cheval possède une composition protéique voisine de celle de l'homme (3, 4, 25, 54, 60) et la thyroxine se fixe sur les mêmes constituants, migrant en

électrophorèse entre les α_1- et α_2-globulines. Il semble que le cheval soit la seule espèce d'animal qui possède une TBP aussi bien individualisée, car dans la plupart des espèces on note souvent deux et même trois protéines fixantes très différentes sur l'électroautoradiogramme en tampon véronal pH 8,6 (5, 46, 48, 49, 50, 53, 56, 60), tandis que les oiseaux manquent entièrement de protéines du type TBP , seules les albumines fixant la T_4 (81). Ce fait nous a encouragé à aborder le fractionnement du plasma de cheval, car nous pouvions disposer de grandes quantités de sang.

Contrairement aux travaux antérieurs qui ont tous été entrepris à partir des fractionnements qui étaient obtenus par la méthode de COHN (11), nous avons trouvé que les β- et γ-globulines ne fixaient pas la T_4 . En effet les radioélectrophorégrammes de ces fractions supplémentées en T_4 marquée montrent que celle-ci demeure à l'origine comme en l'absence de protéines; tandis que toutes les fractions protéiques de COHN, dont certaines correspondent aux β- et γ-globulines, retiennent des quantités plus ou moins grandes de thyroxine (23, 69, 70, 83). On interprétait ce fait en considérant que la TBP était présente dans toutes ces fractions. On peut se demander à la lumière de nos résultats s'il en est bien ainsi ou s'il ne s'agit pas plutôt de protéines en partie dénaturées qui acquièrent alors la capacité de fixer la thyroxine. Par ailleurs, on a supposé que la fraction albuminique qui retient la thyroxine pourrait être due à une contamination globulinique. On doit rejeter cette éventualité, car l'examen du protéinogramme et radioautogramme correspondant au surnageant S_{50}, montre qu'il est possible d'éliminer presque complètement la TBP et que, dans ce cas, T_4 se partage entre l'origine où elle se comporte comme l'acide aminé libre et les albumines avec lesquelles elle migre.

Les fractionnements fins nous ont montré que les fractions les plus riches en TBP étaient celles entre 47-50 et 50-54, lorsque les opérations étaient conduites dans des milieux protéiques de concentration finale de 17,8 mg protéines par ml pour 47-50 et de 12,8 mg/ml pour 50-54. L'enrichissement en TBP correspond à 60 fois lorsqu'on rapporte la capacité fixante de P_{47-50} à la TBP du plasma initial. Des essais de sous-fractionnement ont été tentés entre 44 et 47% , mais il n'a pas été possible d'améliorer notre rendement en TBP. Il semble que le fractionnement par le sel ne permette pas d'obtenir de meilleurs résultats. Néanmoins, ces fractions non dénaturées sont susceptibles d'être utilisées comme matière première dans les méthodes de séparation préparative par chromatographie ou électrophorèse sur colonne,puisqu'elles sont déjà beaucoup plus enrichies en TBP que le produit IV-9 de COHN. Mais dans ce cas la conservation des propriétés de la TBP n'est pas certaine, car les fractions isolées évoluent dans le temps amenant une précipitation de certains lipides.

En conclusion, notre travail n'a pas seulement eu pour conséquence un enrichissement de la TBP du plasma de cheval, mais il a permis de montrer que celle-ci n'est pas due à un artefact de préparation et qu'elle est bien localisée avec les inter α-globulines.

DEUXIEME PARTIE

CAPTATION DES HORMONES THYROÏDIENNES ET DE LEURS DÉRIVÉS ACÉTIQUES PAR LES LEUCOCYTES DE CHEVAL

INTRODUCTION -

Les leucocytes représentent une population de cellules pourvues d'un noyau, douées de propriétés de phagocytose et de mouvements amiboïdes, renfermant des granules qui correspondent aux mitochondries des cellules tissulaires. Leur équipement enzymatique est complet, on a signalé la présence d'un grand nombre d'enzymes, en particulier des phosphatases (7) et des peptidases (20). D'autre part, leur durée de vie in vitro est relativement longue et leur respiration intense (85).

La pénétration cellulaire et le métabolisme périphérique des hormones thyroïdiennes au niveau des récepteurs cellulaires ont fait l'objet de nombreux travaux. Certains ont été conduits sur l'organisme entier (50, 65, 67) et sur des coupes de tissus maintenues en survie (14, 15, 24, 34, 40, 42). Mais les résultats obtenus dans des conditions physiologiques sont masqués par la présence de la TBP plasmatique. Aussi les cellules isolées (29, 30, 31, 68) présentent-elles des systèmes mieux adaptés à l'étude

de la captation spécifique des iodothyronines. A cet effet on a utilisé soit les bactéries (68), mais celles-ci sont équipées d'un système enzymatique différent de celui des cellules animales, soit des hématies (29, 30, 31), qui possèdent une structure spécialisée pour le transport de l'hémoglobine, mais dont l'activité respiratoire est près de 100 fois inférieure à celle des leucocytes. Des préparations de leucocytes humains ont été employées pour mesurer l'influence des hormones thyroïdiennes sur la consommation d'oxygène. Les résultats ont montré une augmentation chez les hyperthyroïdiens et une diminution chez les myxoedémateux (2). Il a été possible d'observer, par la suite, une rapide augmentation de la consommation d'oxygène des leucocytes, isolés du sérum de deux sujets myxoedémateux, recevant une injection intraveineuse de triiodo-L-thyronine ou bien de l'acide triiodothyroacétique (9). Celui-ci, ajouté à une préparation de globules blancs provenant du sang de sujets leucémiques, a provoqué aussi une rapide élévation de la consommation d'oxygène (1).

Ces raisons multiples nous ont incités à choisir les leucocytes pour étudier la pénétration des hormones thyroïdiennes et de leurs dérivés acétiques. Nous nous sommes adressés aux leucocytes de cheval afin d'étendre nos études précédentes, lesquelles ont porté sur le sang de cet animal et par ailleurs nous avons pu les obtenir en quantités suffisantes pour procéder à une préparation pratiquement exempte d'hématies.

Nous indiquons d'abord les méthodes expérimentales que nous avons utilisées dans nos études, puis nous présenterons la préparation des leucocytes et ensuite la captation des iodothyronines et de leurs dérivés acétiques dans diverses conditions expérimentales.

I - MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.-

Nous présenterons en premier lieu la préparation des acides iodothyroacétiques marqués par ^{131}I , utilisés au cours de la deuxième partie de ce travail, ainsi que certaines techniques indispensables pour nos expériences.

Pour désigner les dérivés acétiques des iodothyronines, nous avons adopté les abréviations ou symboles établis d'après les bases de la nomenclature officielle (33):

3,5,3',5'	acide tetraiodothyroacétique	TA_4
3,5,3'	acide triiodothyroacétique	TA_3
3,5	acide diiodothyroacétique	TA_2

Les mesures de la radioactivité et l'autoradiographie ont été opérées comme indiqué dans le paragraphe "méthodes expérimentales" de la première partie (I,1).

1.- Préparation de TA_3 et TA_4 marqués par ^{131}I.-

La préparation des acides 3,5,3',5' tetraiodothyroacétique et 3,5,3' triiodothyroacétique marqués par ^{131}I a été effectuée par iodation de l'acide 3,5 diiodothyroacétique (TA_2), suivant le mode opératoire analogue à celui décrit pour la synthèse de T_4 et T_3 marquées et dans des conditions semblables. L'iodation a été opérée avec 70 µg $^{127}I_2$ sur des quantités de 100 µg de TA_2 (2,4 mg dans 1,2 ml NH_4OH concentré d = 0,85). L'iode est marqué par réaction d'échange en milieu acide avec la quantité voulue de ^{131}INa. Les produits de la réaction en solution dans un volume total de 110 µl, ont été séparés par électrophorèse et chromatographie successives. L'activité spécifique µC/µg de TA_4 (TA_3) est établie de la manière suivante :

$$1\ \mu g\ TA_3 = \frac{^{131}I}{^{127}I} \times 0,204$$

$$1\ \mu g\ TA_4 = \frac{^{131}I}{^{127}I} \times 0,34$$

^{131}I est la quantité d'iode radioactif utilisé et exprimé en µC , ^{127}I celle de l'iode en µg.

0,34 = le poids atomique des deux atomes d'iode fixés par TA_2, divisé par le poids moléculaire de TA_4 .

0,204 = le poids atomique de l'iode fixé par TA_2, divisé par le poids moléculaire de TA_3 .

Dans ces conditions, nous avons obtenu TA_3 marqué d'une activité spécifique comprise entre 26 et 33 µC et TA_4 marqué d'une activité spécifique entre 43 et 55 µC.

2.- Siliconage de la verrerie.-

Toute la verrerie qui était en contact avec les leucocytes pendant leur préparation a été préalablement siliconée. On a employé une solution de Rhodorsil 24 (laboratoire Rhône - Poulenc) diluée à 10 % avec de l'éther. La verrerie, restée pendant une heure dans cette solution, a été lavée et séchée à 120° pendant 1 à 2 heures. Après emploi, un désiliconage a été effectué dans une solution d'acétone et d'eau de Javel 1 : 1 contenant 25 g de pastilles de soude par litre. Après un contact d'une heure dans cette solution la verrerie a été soigneusement lavée, séchée, et ensuite resiliconée.

3.- Numération des globules blancs.-

Pendant toute la manipulation les leucocytes doivent être maintenus dans la glace. On a préparé une

suspension de leucocytes lavés, en ajoutant 3 ml de tampon phosphate 0,2 M à pH 7,5 à 1 ml de suspension. Après avoir bien homogénéisé avec une pipette à boule, on a prélevé 10 µl de cette suspension avec un compte-globules qui permet une dilution de 100 au moyen de liquide Hayem dans les conditions classiques.

La numération est effectuée avec une cellule de Malassez dont 1 carré correspond à 1/100 mm^2 .

Nous avons compté 25 carrés pour chacune de nos préparations leucocytaires. La moyenne ainsi obtenue représente la quantité dans 1/100 mm^2 , elle est multipliée par 10^7 pour obtenir la quantité dans 1 ml de suspension.

II - PRÉPARATION DES LEUCOCYTES.-

De nombreuses méthodes ont été proposées pour isoler les leucocytes du plasma et des autres éléments figurés du sang (46). Il est difficile d'obtenir des préparations dont les leucocytes sont à la fois purs et inaltérés. Les techniques employées n'ont jamais pu réaliser qu'une des deux conditions. Cependant l'étude de la captation des hormones thyroïdiennes et de leurs dérivés acétiques nécessite des leucocytes qui sont d'une part intacts, afin de nous servir comme un témoin valable du comportement cellulaire, et d'autre part assez purifiés afin de ne pas fausser nos résultats par la présence d'hématies qui captent aussi certains produits hormonaux thyroïdiens.

Nous présenterons après la technique d'isolement des leucocytes leur analyse selon les critères exigés pour nos études.

1.- Isolement des leucocytes.-

Principe : Le principe de cette méthode de préparation des leucocytes consiste en des centrifugations successives du sang de cheval hépariné. Les leucocytes, dont la densité est inférieure à celle des hématies, sédimentent entre celles-ci et le plasma. Après élimination du plasma, la couche enrichie en leucocytes est prélevée, puis on procède à de nouvelles centrifugations pour en séparer complètement les hématies.

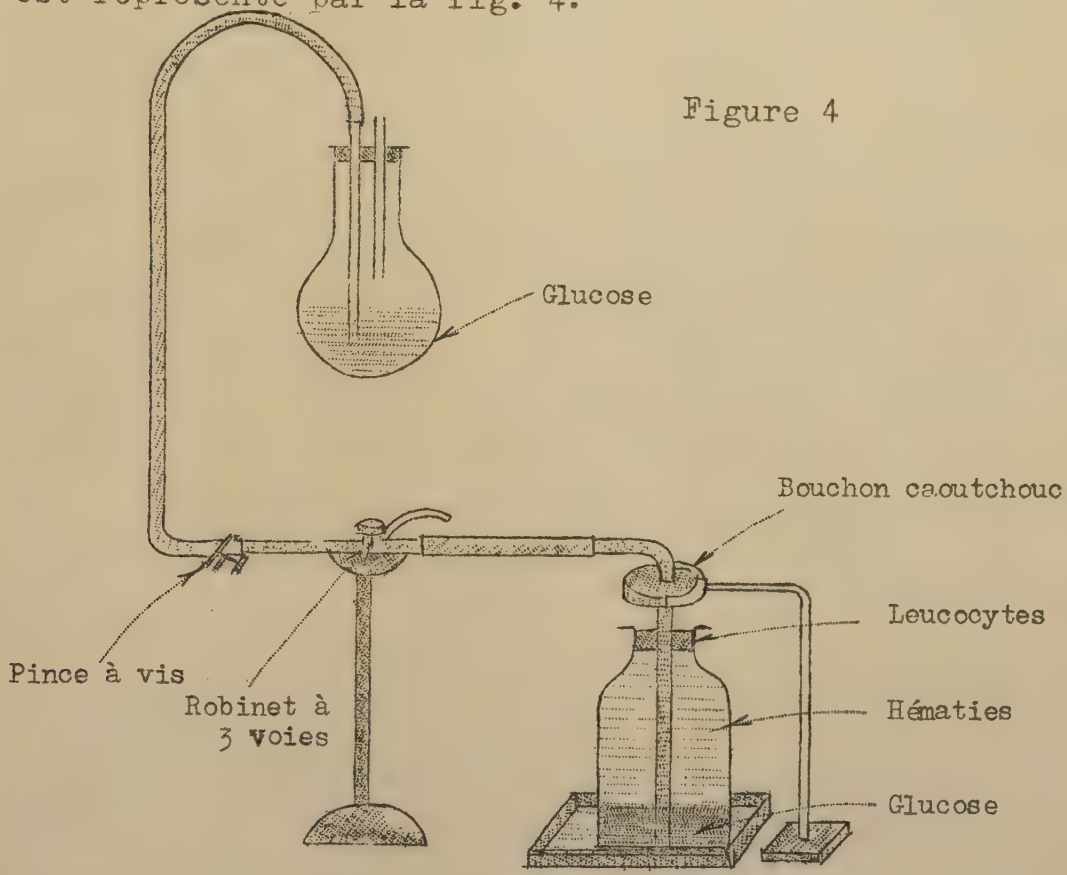
Mode opératoire : Le mode opératoire, inspiré de celui indiqué par MAUPIN (46) comporte plusieurs étapes.

1) Séparation des globules et du plasma : Chaque préparation est effectuée à partir de 4 litres de sang de cheval contenant de l'héparine cristallisée. Le prélèvement du plasma a été opéré comme indiqué dans la première partie (II,1). Après séparation du plasma, les leucocytes sont rassemblés dans une couche au-dessus des hématies. Ils sont prélevés avec une canne de verre courbée dans un flacon en verre siliconé de 500 ml. Un vide très léger facilite la récolte de tous les leucocytes en surface et d'une grande partie de ceux qui se trouvent juste au-dessous. Un volume de 100 ml environ, comprenant les leucocytes et une partie des hématies mélangées avec des leucocytes, est prélevé. On doit avoir un volume total voisin de 500 ml afin que la surface du liquide arrive au goulot du flacon. Ensuite, une deuxième centrifugation pendant 10 minutes à 2500 tours sépare les leucocytes des hématies et du plasma restant.

2) Séparation des leucocytes souillés d'hématies : Le prélèvement de la couche intermédiaire leucocytaire ne peut pas être réalisé directement; on a utilisé un système

de piston liquide,constitué par une solution de glucose saturée à 20° (d = 1,2). Le dispositif d'arrivée du glucose est représenté par la fig. 4.

Figure 4



Un ballon qui contient la solution saturée de glucose, est fixé à un support et fermé avec un bouchon à 2 trous, comportant 2 cannes de verre, dont l'une est connectée avec un long tube en plastique, fermé par une pince à vis. L'extrémité est réunie à l'une des arrivées d'un robinet à 3 voies. La deuxième voie porte un tube latéral destiné à régler le débit et à chasser l'air. La troisième voie, enfin, mène à un tube de verre courbé relié à un bouchon en caoutchouc. On remplit tout le système avec le glucose (sans bulles d'air). On ferme et on introduit lentement la canule de verre, remplie avec le glucose, dans le flacon qui contient les hématies et les leucocytes. Le glucose agit comme un piston qui pousse la couche

leucocytaire vers le haut sans qu'elle se mélange avec les hématies. On règle la vitesse de façon à ce que le glucose coule très lentement. Au moment où les leucocytes arrivent au bord du flacon, on les prélève à l'aide d'une pipette à grosse boule. Pour faciliter l'aspiration, on a connecté la pipette à une seringue de 20 ml. Les leucocytes sont recueillis dans des tubes à centrifuger gradués à 50 ml, maintenus dans de la glace. On met environ 10 ml de suspension leucocytaire dans chaque tube gradué.

3) Purification des leucocytes : on ajoute à 10 ml de suspension leucocytaire 40 ml de NaCl 9 °/oo refroidi et on mélange doucement 5 ou 6 fois avec une pipette à boule. Les lavages consistent en une série de centrifugations successives réalisées à froid en présence de chlorure de sodium à 9 °/oo . Les diverses étapes sont résumées ci-après.

Ière centrifugation — 5 secondes à 700 g
60 secondes à 600 g
le surnageant a été prélevé et le culot mélangé avec 40 ml NaCl 9 °/oo.

2ème centrifugation — 5 secondes à 700 g
45 secondes à 600 g
surnageant prélevé, culot mélangé avec 40 ml NaCl 9°/oo.

3ème centrifugation — 5 secondes à 700 g
30 secondes à 600 g
surnageant prélevé, culot mélangé avec 40 ml NaCl 9°/oo.

4ème centrifugation — 5 secondes à 700 g
20 secondes à 600 g
le surnageant a été prélevé et les leucocytes conservés dans la glace jusqu'au moment de l'emploi.

Parfois un 5ème lavage est nécessaire pour com-

pléter l'élimination des hématies. La température inférieure à 2° est très importante, car elle est le seul moyen d'éviter l'agglutination des leucocytes. Le temps joue également un rôle. L'ensemble des manipulations est effectué en moins de 3 heures.

2.- Analyse des préparations leucocytaires -

On vérifie que les manipulations n'ont pas lésé les leucocytes par observation au microscope en contraste de phase et on mesure la consommation d'oxygène déterminée par la méthode de Warburg en présence de tampon phosphate 0,2 M à pH 7,5. Nous avons trouvé que le coefficient respiratoire est compris entre 32,2 et 91,5 micromoles O_2 par heure et par 10^{10} GB. (globules blancs).

La quantité d'hématies présentes dans nos préparations de leucocytes a été examinée avant chacune de nos expériences. Dans la plupart de nos préparations nous avons trouvé 2 à 4 hématies pour 100 leucocytes.

Les protéines leucocytaires sont dosées soit par la méthode de KJELDAHL, soit par la méthode spectrophotométrique différentielle précédemment indiquée (Ière partie: I, 3).

Les valeurs trouvées avec la méthode de KJELDAHL sont comprises entre 1,2 et 1,4 mg de protéines pour 10^7 GB et de 1,1 et 1,3 mg protéines / 10^7 GB par la méthode optique.

Les quantités de leucocytes utilisées dans la plupart de nos expériences correspondent donc à une teneur en protéines d'environ 19 mg pour 15.10^7 globules blancs.

Discussion

Les particularités intervenant dans les nombreuses méthodes de préparation des leucocytes diffèrent d'abord par la façon de rendre incoagulable le sang. On a utilisé l'E.D.T.A. (acide éthylène-diamine-tétracétique) (46) pour complexer le calcium. Mais cet agent est susceptible non seulement de modifier les propriétés enzymatiques des globules (51), mais encore d'interférer avec les hormones thyroïdiennes. On a pratiqué aussi le battage de sang (16), mais d'une part l'agitation donne un rendement bas, car une partie des granulocytes neutrophiles est retenue dans les mailles de la fibrine (19), d'autre part les leucocytes sont souvent lésés. L'emploi de l'héparine est préférable, et c'est le produit que nous avons utilisé. Cependant nous avons eu recours à l'héparine cristallisée (114 U.I/mg) et non aux solutions commerciales d'héparine (5000 U.I/ml), car elles sont stabilisées par des substances qui sont des effecteurs de certains enzymes.

Les techniques préconisées pour la séparation des globules blancs ont été réalisées en changeant l'un des facteurs qui conditionne leur sédimentation. On a utilisé des produits de poids moléculaire élevé formant des rouleaux avec les hématies et augmentant ainsi leur vitesse de sédimentation. Le fibrinogène a été la première substance employée avec succès (28). Ses inconvénients sont dûs au fait qu'il entraîne une importante contamination des leucocytes par les hématies. Le dextrane a été utilisé en présentant les mêmes désavantages (32). La polyvinylpyrrolidone (26, 47) semble être préférable. Cependant, comme toutes ces substances sont de poids moléculaire élevé, elles sont susceptibles de fixer plus ou moins intensément les produits hormonaux thyroïdiens et, par conséquent, de modifier leurs effets sur les leucocytes.

A côté des méthodes de sédimentation on a pratiqué l'hémolyse des hématies (8, 74), basée sur la différence de la résistance osmotique, celle-ci étant plus grande pour les leucocytes que pour les hématies. L'emploi d'agents d'hémolyse, tels que les saponines ou la granicidine, nuisent aux enzymes des leucocytes (41, 89). Enfin, des méthodes de flottaison ont été employées (75, 87) en ajustant le poids spécifique du milieu de centrifugation avec des substances dont l'élimination présente d'assez grandes difficultés.

Nous avons choisi, pour nos expériences, le sang de cheval qui sédimente rapidement et permet d'obtenir une couche leucocytaire assez bien individualisée, ce qui nous a épargné l'addition de toute substance étrangère. Nous avons vu recours à des centrifugations différentielles pour faciliter la séparation des leucocytes. La faible vitesse des centrifugations a évité l'altération des cellules. L'élimination des hématies de la couche leucocytaire est réalisée par des lavages au moyen de solutions salines isotoniques glacées, suivis de centrifugations. Ces opérations laissent les hématies dans la couche supérieure, alors que normalement, plus denses, elles auraient dû sédimenter. Il semble que l'emploi de telles solutions modifie et altère les hématies, alors que les leucocytes plus stables demeurent inchangés. En effet, examinés au microscope en contraste de phase, ces derniers se présentent comme des cellules intactes. A cette intégrité morphologique correspond le maintien de leurs activités biologiques, mises en évidence par leur consommation élevée d'oxygène. Par la méthode que nous avons adoptée, le rendement des leucocytes est voisin de 80 %, calculé à partir de leur richesse dans le sang. On obtient en général, à partir de 4 litres de sang de cheval, de 0,8 à 3,2 x 10^{10} leucocytes, contaminés par très peu d'hématies : dans les conditions

les plus défavorables, 1 hématie pour 10 leucocytes, mais pour de nombreuses préparations on a compté 1 à 3 hématies pour 100 leucocytes.

III - CAPTATION DES IODOTHYRONINES ET DE L'ACIDE TRIIODOTHYROACÉTIQUE PAR LES LEUCOCYTES.-

INTRODUCTION

La respiration des leucocytes est sous la dépendance des états thyroïdiens. Dans les hyperthyroïdies on constate un coefficient respiratoire augmenté, il est diminué dans les hypothyroïdies. Or, la concentration de l'iode hormonal sanguin (PBI) est également fonction de l'activité thyroïdienne; normalement de l'ordre de 7 µg/100 ml de sérum, il peut dépasser 20 µg/100 ml de sérum dans la maladie de Basedow, et il est inférieur à 1 µg/100 ml de sérum dans les myxoedèmes ou les athyroïdies. On peut donc supposer que l'activité respiratoire des leucocytes est fonction de l'iodo-hormonémie, ce qui suppose que les globules blancs sont capables de concentrer les iodothyronines ou certains de leurs dérivés.

C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris des recherches systématiques dans le but de préciser si les iodothyronines et leurs dérivés acétiques sont concentrés par les leucocytes. Dans une première série d'expériences, nous avons étudié la captation de ces produits dans des conditions expérimentales diverses de temps, température, concentration. Dans une seconde série, nous avons essayé de préciser leur distribution subcellulaire et de caractériser des protéines solubles, fixant la T_4.

Nous avons montré précédemment l'importance de la TBP sur la nature des hormones circulantes. Dans le cas

de la thyroxine une très faible quantité de T_4 reste libre dans le plasma, la quasi totalité y étant sous forme de complexe. Or, on a émis l'hypothèse que seule la forme libre est susceptible de pénétrer dans les cellules. Aussi, dans une troisième série d'expériences, avons-nous comparé la pénétration leucocytaire des hormones et de leurs dérivés acétiques en fonction de quantités variables de sérum afin de vérifier cette hypothèse.

1.- Pénétration des produits hormonaux en milieu isotonique phosphaté.-

Nous avons étudié la captation des divers produits iodés d'une part en présence de leucocytes intacts pour une concentration fixe des produits iodés et en fonction de leurs concentrations, d'autre part en présence de fragments leucocytaires en étudiant la distribution subcellulaire de T_3 et de TA_3 et en caractérisant une protéine leucocytaire fixant T_4.

A. Captation des produits iodés en présence de leucocytes intacts -

L'étude de la captation des hormones thyroïdiennes a été réalisée en ajoutant à des suspensions leucocytaires en milieu phosphaté des produits hormonaux marqués par ^{131}I (en ortho par rapport à la fonction phénol).

a) Captation des divers produits iodés pour une concentration de $3,2 \times 10^{-9}$ M (= 3,2 nµM).

Conditions expérimentales :

Les produits hormonaux utilisés sont la L-thyroxine marquée en 3',5' (T_4), la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine marquée en 3' (T_3), l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique marqué en 3' (TA_3) et, dans quelques expériences, l'acide 3,5,3',5'-tetraiodothyroacétique marqué en 3',5' (TA_4).

La préparation des produits radioactifs a été indiquée précédemment. Ils sont conservés sur le papier du chromatogramme, lequel est découpé en petites bandes et élué par du n-butanol saturé d'eau juste avant l'expérience. L'éluat est évaporé sous courant d'azote, son résidu sec repris par 2 ou 3 gouttes de NaOH 0,1 N. Les préparations renferment une quantité d'iodures toujours inférieure à 10 %. Les mesures de la radioactivité des produits marqués sont effectuées dans un compteur à scintillations à cristal creux (NaI-TL, Tracerlab).

Nos essais ont été pratiqués avec des volumes de 5 ml de tampon phosphaté 0,2 M,pH 7,5, renfermant 3×10^7 globules blancs par ml, en sorte que 1 ml de suspension leucocytaire est ajouté aux produits hormonaux marqués par ^{131}I à une concentration finale de $3,2 \times 10^{-9}$ M par litre, repris par 4 ml de tampon phosphaté 0,2 M,pH 7,5. Les leucocytes sont en général utilisés moins de 3 heures après leur isolement. L'incubation à 37°C est opérée à des temps différents dans un appareil Warburg,dont la fréquence est réglée à 165 aller et retour par minute avec une amplitude de 3,5 cm. Les essais à 0°C sont conduits dans le même appareil, maintenu à cette température au moyen de glace pilée. Sitôt après incubation, on recueille le culot de leucocytes par centrifugation à 4850 g pendant 5 minutes et on mesure sa radioactivité dans le même tube à essai au compteur à scintillations.Trois lavages du culot avec 2 ml de tampon phosphaté 0,2 M,pH 7,5 n'amenant pratiquement plus de changement, nous avons, dans nos expériences, toujours employé trois lavages. Les travaux conduits à 0°C sont analogues, mais toutes les manipulations ont été effectuées à la température de la glace fondante, et, pendant les lavages, la température est toujours demeurée inférieure à 6°C. Chaque expérience est effectuée

en double. Les résultats présentés correspondent à la moyenne d'au moins 5 expériences.

Résultats

La radioactivité fixée par les leucocytes après trois lavages nous permet de comparer la fixation de T_4 avec celle de T_3 et de TA_3 et pour certains essais avec celle de TA_4

α) en fonction du temps :

La figure 5 illustre le pourcentage de T_4 , de T_3 et de TA_3 fixé par les leucocytes en fonction du temps, l'incubation conduite à une température de 37°C.

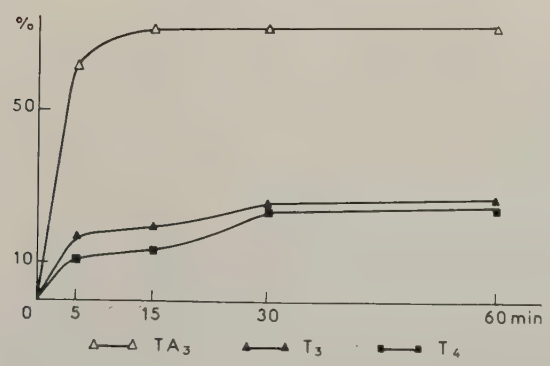


Figure 5

Pourcentage de T_4 , T_3 et TA_3 fixés par les leucocytes en fonction du temps en minutes.
Concentration des hormones : $3,2 \times 10^{-9}$ M
Concentration des leucocytes : 3×10^{7} GB / ml.

L'acide triiodothyroacétique est capté plus rapidement et plus intensément que les iodothyronines.

β) pour des températures différentes :

Comme à la température de 37°C des modifications métaboliques étant susceptibles de se produire, nous avons effectué une expérience à 0°C en prolongeant l'incubation pendant 30 minutes; les résultats de cette expérience sont rassemblés sur le tableau II, auxquels on a ajouté à titre de comparaison ceux obtenus avec la même préparation de leucocytes après incubation de 5 minutes à 37°C.

Tableau II

Pourcentage de T_4, TA_4, T_3 et TA_3 fixé par les leucocytes.
Concentration des hormones : $3,2 \times 10^{-9}$ M (= 3,2 mμM)
Concentration des leucocytes : 3×10^7 GB / ml.

Température	% pourcentage des produits iodés fixés			
	T_4	TA_4	T_3	TA_3
0°C (30 minutes)	14,5	52,5	19,0	35,0
37°C (5 minutes)	14,2	71,0	19,2	58,0

Les valeurs trouvées pour les iodothyronines sont très voisines malgré les conditions d'incubation différentes. Par contre, la pénétration des acides iodothyroacétiques est plus sensible à l'action de la température.

γ) en fonction du nombre de lavages :

Les fixations des iodothyronines, soit après un temps court à 37°C, soit après une incubation à 0°C de 30 minutes, étant faibles, nous avons cru utile d'étudier la captation des hormones thyroïdiennes en fonction du nombre de lavages afin d'éliminer éventuellement les iodures formés au cours de l'incubation.

Le Tableau III illustre le pourcentage de T_4, T_3 et TA_3 fixés en fonction du nombre de lavages pour une expérience réalisée après un temps court de 5 minutes ou après incubation de 30 minutes.

Tableau III

Pourcentage de T_4, T_3, TA_3, fixés par les leucocytes au cours des lavages.
Concentration des hormones : $3,2 \times 10^{-9}$ M
Concentration des leucocytes : 3×10^7 GB / ml.

	Nombre de lavages	Pourcentage des produits iodés		
		T_4	T_3	TA_3
1°) incubation à 37°C pendant 5 minutes	0	15,0	19,8	81,0
	1	11,6	16,8	77,5
	2	10,6	15,5	73,0
2°) incubation à 37°C pendant 30 minutes	0	30,5	31,7	82,0
	1	25,4	27,5	78,5
	2	24,0	27,0	74,5

Un premier lavage enlève pratiquement tous les produits simplement adsorbés et les substances non complexées. Trois lavages sont donc largement suffisants pour obtenir leur élimination totale. Ce sont ces conditions que nous avons généralement utilisées. Nous avons soumis à électrophorèse en tampon $CO_3(NH_4)_2$: CH_3COONH_4 0,05 M pH 8,2 pendant deux heures sous 400 volts et sur papier Whatman 1, la suspension leucocytaire avec T_4, T_3 et TA_3, après incubation de 30 minutes à 37°. Par comptage le long de l'électrophorèse et par radioautographie, nous n'avons pu mettre en évidence que des traces d'iodures, moins de 2 %, quelle que soit la substance iodée utilisée.

Discussion

De l'ensemble de nos expériences, il ressort que les produits hormonaux thyroïdiens sont captés par les leucocytes; mais on constate que la fixation des iodothyronines est, non seulement plus faible que celle du TA_3, mais encore que les mécanismes de concentration sont différents, puisqu'on observe une variation brusque de leur pénétration entre la 15ème et la 30ème minute. Il semble que, dans la première étape, la fixation des iodothyronines ne provienne que d'un phénomène physique relativement simple en liaison avec la capacité de la captation des protéines intra-leucocytaires, puisqu'il ne semble pas dépendre de la température. Néanmoins, la quantité retenue par les globules blancs est importante si on considère la concentration dans le volume qu'ils occupent par rapport au milieu d'incubation. En effet, après hématocryte le volume ne correspond qu'à 0,13 ml environ pour un volume total de 5 ml, soit sensiblement le 40ème. S'il s'agissait d'une simple diffusion, la radioactivité des leucocytes ne devrait être voisine que de 2,5 %, tandis qu'elle est respectivement de 6 à 8 fois plus élevée avec T_4 et T_3.

La seconde étape doit être reliée à une distribution de ces hormones à l'intérieur des leucocytes, ou à l'influence de la perméabilité de la membrane leucocytaire, plutôt qu'à des modifications métaboliques, car il n'a pas été possible de mettre en évidence, après 30 minutes d'incubation à 37°C, l'apparition d'iodures.

Les acides iodothyroacétiques se comportent tout à fait différemment. Ils sont concentrés très rapidement et très intensément , même à 0°C il n'a pas été possible de démontrer l'existence d'un phénomène distinct. Ce comportement peut expliquer les résultats obtenus avec TA_3 sur la respiration des leucocytes, dont la consommation d'oxygène est augmentée jusqu'à 54 %, alors qu'elle est nettement plus faible avec les iodothyronines (9). A la lumière de nos expériences, on peut donc considérer que TA_3 atteint immédiatement la position intracellulaire, où il exerce son effet.

b) Captation leucocytaire en fonction de la concentration des produits iodés.

Conditions expérimentales

Nous avons choisi des concentrations d'hormone de $3,2 \times 10^{-9}$ M , $3,2 \times 10^{-7}$ M et $3,2 \times 10^{-5}$ M. Pour une concentration supérieure à $3,2 \times 10^{-5}$ M l'utilisation de la L-thyroxine à pH 7,5 n'est plus possible par suite de son insolubilité. Pour toutes ces expériences nous avons employé des solutions d'hormone marquée comme traceur, les concentrations $3,2 \times 10^{-7}$ M et $3,2 \times 10^{-5}$ M sont obtenues en ajoutant de l'hormone entraîneur. On a préparé les solutions de l'hormone stable avec le tampon phosphate 0,2 M à pH 7,5 , contenant 2 ml NaOH N/100 ml. Des prises d'essai de 0,1 ml comportent la quantité nécessaire pour la concentration $3,2 \times 10^{-7}$ M , celles de 4 ml la quantité

nécessaire pour la concentration $3,2 \times 10^{-5}$ M . Les pH n'ont pas été supérieurs à 7,8.

Résultats

Les expériences ont été réalisées

α.) à 37°C pour un temps court, 5 minutes,

β.) à 0°C pour un temps long, 30 minutes

dans des conditions semblables à celles indiquées précédemment.

Les tableaux IV α et IV β rendent compte respectivement des résultats obtenus.

Tableau IV α

Captation des divers produits iodés par les leucocytes en fonction de leur concentration.
(3×10^7 leucocytes par ml)

α.) Incubation à 37°C pendant 5 minutes

Concentration en M / l	Captation en % de produits iodés		
	T_4	T_3	TA_3
$3,2 \times 10^{-9}$ M/l	13,5	17,3	65,0
$3,2 \times 10^{-7}$ M/l	13,2	18,0	62,5
$3,2 \times 10^{-5}$ M/l	14,3	16,5	53,0

Tableau IV β

Captation des divers produits iodés par les leucocytes en fonction de leur concentration.
(3×10^7 leucocytes par ml.)

β.) Incubation à 0°C pendant 30 minutes

Concentration en M / l	Captation en % de produits iodés		
	T_4	T_3	TA_3
$3,2 \times 10^{-9}$ M/l	12,5	16,0	37,0
$3,2 \times 10^{-7}$ M/l	13,0	17,5	36,0
$3,2 \times 10^{-5}$ M/l	25,0	18,0	30,0

Les résultats obtenus pour une concentration de $3,2 \times 10^{-5}$ M de T_4 à 0°C sont certainement entachés d'erreurs par excès, à cause de la faible solubilité à pH 7,5 à 0°C. Les lavages répétés avec des solutions de tampon phosphate à un même pH ne sont pas suffisants pour séparer la T_4 insolubilisée de celle retenue par les cellules.

Discussion

La captation des deux iodothyronines par les leucocytes est pratiquement indépendante de leur concentration dans le milieu. En effet, elle est sensiblement la même pour une teneur physiologique de 3×10^{-9} M et pour un taux 10 000 fois plus grand. Ce résultat traduit le fait que la capacité de captation leucocytaire des hormones

thyroïdiennes est considérable et que la saturation n'est pas atteinte même avec des doses où l'on approche de l'insolubilité de T_4 ; d'ailleurs cette insolubilité est atteinte à 0°C, car il est impossible de séparer la fraction retenue par les leucocytes de celle adsorbée sur eux.

La fixation de TA_3 dépend très peu de la concentration, il semble néanmoins qu'elle baisse légèrement quand la teneur augmente. Néanmoins elle demeure très forte puisque, pour $1,5 \times 10^8$ leucocytes, renfermant 19 mg environ de protéines et $3,2 \times 10^{-5}$ M de TA_3 dans le volume de 5 ml , les globules blancs en retiennent 50 %. Il apparaît donc que 50 µg sont fixés par les 19 mg de protéines, soit près de 0,25 % , ce qui démontre une affinité considérable des leucocytes pour l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique.

B. Captation de produits iodés en présence de fragments leucocytaires

Les produits hormonaux thyroïdiens sont rapidement concentrés par les leucocytes et, une fois captés, ils y demeurent retenus. Nous avons voulu préciser si cette fixation avait lieu sur un élément subcellulaire particulier ou bien si elle n'était pas spécifique. Dans ce but nous avons réalisé deux séries d'expériences. La première a consisté à fragmenter les leucocytes ayant préalablement fixé T_3 ou TA_3 marqués et à mesurer les diverses fractions subcellulaires. La seconde a comporté, après une séparation préalable de celles-ci, l'extraction des protéines solubles et la caractérisation électrophorétique d'une protéine fixant T_4 .

a) Distribution subcellulaire de T_3 et TA_3 .

Les leucocytes ont été séparés en quatre parties : membranes et noyaux, granules, microsomes et extrait soluble. La captation de la triiodothyronine et de son dérivé

acétique a été étudiée pour une température et une concentration définies.

Conditions expérimentales

On ajoute à 40 ml de tampon phosphaté 0,2 M à pH 7,4, renfermant soit T_3, soit TA_3 à une concentration finale de $3,2 \times 10^{-9}$ M, 10 ml d'une suspension leucocytaire contenant $1,6 \times 10^9$ globules blancs. On porte à 37°C pendant 5 minutes, puis on centrifuge à 4850 g pendant 5 minutes. Au culot leucocytaire, lavé trois fois par 20 ml tampon phosphaté, on ajoute alors 30 ml d'eau distillée, ce qui provoque l'éclatement de nombreuses cellules. On achève leur destruction par homogénéisation pendant une minute dans un appareil de Potter à piston serré en verre, fixé à un moteur tournant 700 tours par minute. Le nombre d'aller et retour était de 15 environ. Dans ces conditions, on observe sous microscope à contraste de phase que tous les globules blancs sont éclatés. On procède ensuite à des centrifugations différentielles pour en séparer les noyaux et membranes, les granules et les microsomes. La première centrifugation est pratiquée à 1000 g à une température de 0°C pendant 10 minutes (International centrifuge). Le culot constitué par les membranes et les noyaux est séparé quantitativement; le surnageant est soumis à une centrifugation de 22 000 g pendant 12 minutes (Spinco modèle L) pour en séparer les granules, particules qui correspondent aux mitochondries des autres cellules. Le surnageant est centrifugé pendant 1 heure à 100 000 g, ce qui permet de recueillir les microsomes; le surnageant est conservé. La radioactivité des diverses fractions est mesurée au compteur γ à cristal creux.

Résultats

Les résultats obtenus et représentés sur le tableau V sont la moyenne de 3 essais provenant de 3 prépa-

rations leucocytaires différentes. Ils sont exprimés en pour cent fixé par chacune des fractions par rapport à la quantité totale du milieu.

Tableau V

Pourcentage de T_3 et TA_3 captés par les diverses fractions de leucocytes après incubation à 37°C pendant 5 minutes. Concentration d'hormone : $3,2 \times 10^{-9}$ M ; concentration leucocytaire 3×10^7 GB / ml.

Nature de produits iodés	% fixé par les leucocytes	% retenu sur les diverses fractions leucocytaires			
		Noyaux + Membranes	Granules	Microsomes	Surnageant
T_3	25,3	10,9	5,8	1,05	1,37
TA_3	75,5	23,5	15,7	5,9	13,3

Comme on peut le constater, les quantités de produit marqué retrouvées sur les diverses fractions subcellulaires ne correspondent qu'à 19 % pour T_3 au lieu de 25% et seulement de 58 % au lieu de 75,5 % pour TA_3 . Les différences correspondent aux pertes consécutives aux manipulations.

Discussion

Nous avons montré jusqu'ici que T_3 et TA_3 résistaient aux lavages des leucocytes par des solutions salines isotoniques. Nos dernières expériences apportent la preuve

de leur pénétration à l'intérieur des cellules, puisque nous avons récupéré près de 30 % de la radioactivité fixée par les globules blancs dans les granules, microsomes et protéines solubles après incubation avec T_3 , alors que cette proportion dépasse 43 % dans le cas de TA_3 . Il est difficile de faire la part exacte qui revient aux noyaux et membranes, mais on peut supposer que celles-ci sont plus riches que ceux-là; aussi on peut considérer que TA_3 est, non seulement capté plus intensément que T_3 , mais encore qu'il pénètre plus facilement les membranes leucocytaires pour atteindre le lieu où il exerce son action.

b) Caractérisation d'une protéine leucocytaire soluble, fixant T_4

L'extraction des protéines solubles des leucocytes nécessite la destruction préalable de leurs membranes. Nous avons employé la méthode d'homogénéisation de Z.COHN (12) suivie de la séparation des fragments insolubles (membranes, noyaux, granules et microsomes) des protéines intracellulaires solubles en milieu alcalin à pH 9. Les protéines solubles dans ces conditions sont étudiées par radioélectrophorèse.

Conditions expérimentales

Deux essais ont été réalisés. Pour le premier (Essai 1) on part d'une suspension de leucocytes dans 34 ml de tampon phosphate, renfermant 6,8 x 10^9 de globules blancs, que l'on centrifuge pendant 5 minutes à 4850 g . Le culot est lavé avec 40 ml saccharose 0,34 M , puis centrifugé à nouveau de façon à en éliminer les sels inorganiques. Les leucocytes remis en suspension dans du saccharose 0,034 M sont en partie brisés. Au moyen d'une seringue on aspire le liquide, puis on le chasse violemment. On répète plu-

sieurs fois cette opération jusqu'à ce que l'on constate sous microscope à contraste de phase que toutes les cellules ont éclaté. L'homogénat est centrifugé à 100 000 g à 0°C pendant 1 heure (Spinco modèle L).

Le culot renferme les membranes, noyaux, granules et microsomes; le surnageant contient les protéines intracellulaires solubles. Le culot est ensuite extrait par 15 ml $CO_3(NH_4)_2$ 0,05 M à pH 9 après homogénéisation au moyen d'une seringue pendant 10 minutes. La suspension est recentrifugée à 100 000 g pendant 1 heure. Le surnageant est dialysé à l'eau distillée. Le sac à dialyse est placé sous un séchoir à air pour concentrer le liquide jusqu'à un volume de 1 à 2 ml. Un précipité, qui s'est formé au cours de la dialyse, est redissous en amenant le pH à 8,5-9 au moyen de soude très diluée. Cette solution renferme 10,2 mg de protéines par ml. Une électrophorèse de cet extrait, supplémenté par 0,07 µg de T_4 par ml, est opérée en tampon véronal sodique 0,06 M, pH 8,6 pendant 15 heures à intensité constante de 0,3 mA par cm de papier sous une tension initiale de 130 Volts.

Dans une deuxième expérience (Essai 2) on a ajouté 1 µg T_4 à 8 x 10^9 globules blancs. Après une incubation de 30 minutes à 37°C , les leucocytes, ayant fixé T_4, sont recueillis par centrifugation de 5 minutes à 4850 g et lavés 2 fois. Le culot est ensuite soumis aux mêmes opérations que précédemment. La solution protéique terminale, obtenue après dialyse et concentration, est analysée par électrophorèse et radioautographie.

Résultats

Les électrophorégrammes et radioélectrophorégrammes des essais 1 et 2 sont représentés par la figure 6, sur laquelle on a placé en A 1 et A 2 les protéinogrammes et en B 1 et B 2 les autoradiogrammes correspondants.

On constate que T_4 , ajoutée après fractionnement ou captée par les leucocytes intacts, migre dans le champ électrique à 2,3 cm , alors que T_4 libre demeure en général à l'origine de l'électrophorégramme.

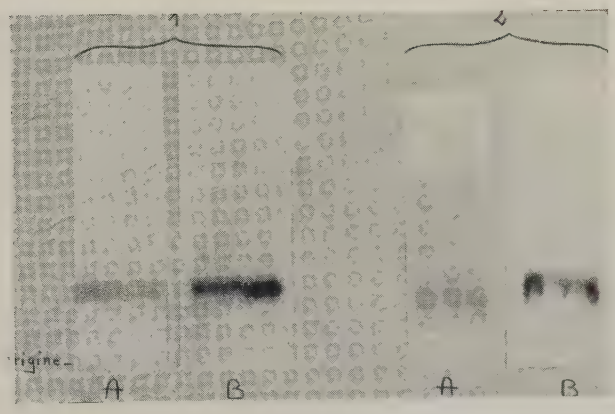


Figure 6

Radioélectrophorégrammes des protéines solubles, extraites des particules leucocytaires.

A : électrophorégrammes révélés au vert brillant

B : radioélectrophorégrammes

(1): T_4 ajoutée après fractionnement

(2): T_4 captée par les leucocytes intacts, fractionnés par la suite.

Discussion

La fixation de T_4 par les leucocytes semble s'expliquer par l'existence d'une TBP intracellulaire. Cette protéine soluble est de nature différente de la TBP plasmatique, mais elle complexe comme celle-ci la T_4 et sa capacité de fixation est considérable. Sa nature demeure inconnue, mais si on compare sa migration avec celle des protéines sériques, on peut considérer qu'elle s'apparenterait aux Y-globulines, alors que ces dernières, d'origine plasmatique, n'ont aucun pouvoir fixant pour T_4 . La nature différente des deux types de TBP , des leucocytes et du plasma, régit vraisemblablement les échanges de T_4 entre celui-ci et les globules blancs.

2.- Pénétration des produits hormonaux en présence de quantités croissantes de sérum de cheval.-

La répartition de la T_4 entre les cellules et le milieu interstitiel dépend des deux types de TBP , l'une intra- et l'autre extra-cellulaire. Or, puisque les leucocytes en milieu isotonique phosphaté captent les produits thyroïdiens, ce qui implique la présence de TBP intracellulaire, dont nous avons montré qu'elle différait de la TBP plasmatique, il nous a paru intéressant d'étudier la pénétration leucocytaire des hormones thyroïdiennes et de l'acide triiodothyroacétique en présence de quantités variables de plasma et pour des concentrations variables d'hormone.

Conditions expérimentales

Deux séries d'expériences ont été effectuées, l'une comporte une incubation de 5 minutes à 37°C, l'autre de 30 minutes à 0°C. Dans les deux cas, à $1,5 \times 10^8$ leucocytes, mis en suspension dans un tampon phosphate 0,2 M à

pH 7,5 , on ajoute de 15 à 60 µl de sérum de cheval. Après équilibration de la température, on ajoute sous un volume de 10 à 20 µl le produit iodé radioactif de façon à obtenir la concentration voulue. Les conditions d'incubation sont les mêmes que celles adoptées pour le milieu tampon phosphaté seul. Les leucocytes sont, comme dans cet essai, recueillis par centrifugation, lavés 3 fois par du tampon phosphaté et leur radioactivité déterminée au compteur à scintillations (cristal creux de INa).

Résultats

Les résultats obtenus ont été rapportés comme suit :

A. Captation des produits iodés hormonaux en fonction de la concentration en protéines sériques -

La figure 7 représente le pourcentage des produits iodés hormonaux fixés par les leucocytes en fonction de la concentration de protéines sériques, exprimée en mg/ml pour des concentrations hormonales et des températures différentes.

a.) Pour une température de 37°C : incubation pendant 5 minutes.

b.) Pour une température de 0°C : incubation pendant 30 minutes.

B. Captation des produits iodés hormonaux en fonction de leur concentration -

Le tableau VI illustre le pourcentage des produits iodés fixés par les leucocytes en fonction de la concentration hormonale pour des concentrations définies de protéines sériques comprises entre 0 et 1 mg/ml.
a.) Pour une température de 37°C : incubation pendant 5 min.
b.) Pour une température de 0°C : incubation pendant 30 min.

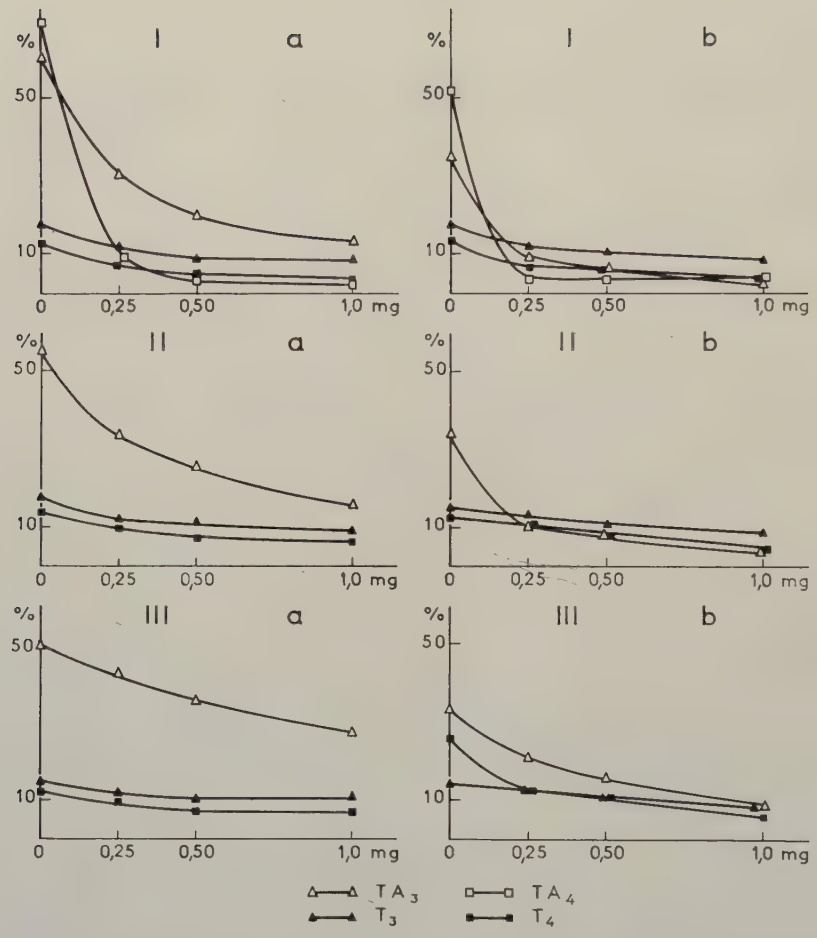


Figure 7

Pourcentage de T_4 , T_3 et TA_3 (TA_4) fixés par les leucocytes en fonction de la concentration de protéines sériques en mg/ml
Concentration des leucocytes : 3 x 10^7 GB / ml.
a : incubation à 37°C pendant 5 minutes.
b : incubation à 0°C pendant 30 minutes.
I : concentration d'hormone : 3,2 muM

Tableau VI

Pourcentage de produit hormonal fixé par 3×10^7 GB / ml en fonction de sa concentration exprimée en mμM en présence de quantités variables de protéines sériques.

a) Incubation à 37°C pendant 5 minutes

mg de protéines sériques par ml	% de captation des différents produits iodés à diverses concentrations en mμM								
	T_4			T_3			TA_3		
	3,2	$3,2 \times 10^2$	$3,2 \times 10^4$	3,2	$3,2 \times 10^2$	$3,2 \times 10^4$	3,2	$3,2 \times 10^2$	$3,2 \times 10^4$
0	13,2	13,9	14,8	18,6	17,2	15,0	60,3	55,2	49,9
0,25	7,4	10,2	12,1	12,1	12,2	12,4	30,7	33,4	43,1
0,5	5,1	7,2	7,4	9,0	10,1	7,2	20,0	25,1	36,3
1,0	4,0	7,1	7,0	8,3	8,9	7,0	13,2	15,1	27,0

b) Incubation à 0°C pendant 30 minutes

mg de protéines sériques par ml	% de captation des différents produits iodés à diverses concentrations en mμM								
	T_4			T_3			TA_3		
	3,2	$3,2 \times 10^2$	$3,2 \times 10^4$	3,2	$3,2 \times 10^2$	$3,2 \times 10^4$	3,2	$3,2 \times 10^2$	$3,2 \times 10^4$
0	12,9	13,2	25,5	18,5	15,6	13,1	35,3	38,4	30,2
0,25	7,1	8,3	15,1	12,6	12,5	12,0	9,1	10,6	21,0
0,5	5,2	7,6	12,2	11,2	11,4	10,3	5,6	7,1	16,2
1,0	4,0	6,2	8,0	9,1	9,0	9,1	3,2	4,3	8,9

Discussion

L'addition de quantités croissantes de sérum de cheval au milieu dans lequel sont incubés les leucocytes se traduit par une diminution progressive de la captation des iodothyronines et de leurs dérivés acétiques par les globules blancs.

Pour une concentration de 0,25 mg de protéines sériques par ml de tampon phosphaté, soit sensiblement 0,3 ml de sérum pour 100 ml , plus de 60 % de T_4 demeure intracellulaire par rapport au milieu seul quand on se place à 37°C (Tableau VI a.).

Des diminutions du même ordre sont constatées quand la température est de 0°C,ainsi qu'avec tous les autres produits iodés. La généralité de ce phénomène nous permet de considérer que la TBP plasmatique joue un rôle limité,malgré le fait qu'elle fixe beaucoup plus intensément la T_4 que les autres substances, soit que la TBP leucocytaire est nettement plus puissante et que son seuil de saturation est plus élevé. Il semble bien que cette 2ème éventualité soit la bonne,car l'effet des protéines sériques est pratiquement indépendant de la concentration hormonale.

Quand on ajoute au milieu 1 mg de protéines sériques par ml, la pénétration intraleucocytaire est nettement inhibée lorsque la quantité des produits hormonaux est la plus faible. Mais même dans ces conditions où la TBP plasmatique est loin d'être saturée en T_4 , les leucocytes retiennent encore des quantités non négligeables de celle-ci, surtout si l'on considère le volume des globules blancs qui est environ de 2,5 % de celui du milieu d'incubation. Quand on augmente la concentration des différents produits iodés pour arriver à une teneur finale de 3×10^{-5} M , on constate que la pénétration augmente consi-

dérablement avec TA_3 , faiblement, mais de façon significative avec les iodothyronines si l'incubation est conduite à 37°C.

Ce résultat traduit le fait que,lorsque la quantité du produit hormonal libre augmente,sa pénétration est plus grande.

La captation est réduite à 0°C.

Nous avons déjà envisagé la possibilité de deux étapes consécutives dans la captation de T_3 et T_4, l'une rapide,pratiquement indépendante de la température, l'autre plus lente qui fait défaut lorsqu'on opère au voisinage de 0°C. La première semble subsister seule quand le milieu est additionné de sérum. On peut se demander alors si la seconde ne constitue pas un mécanisme biologique,lié à la perméabilité de la membrane,pouvant éventuellement nécessiter un apport d'énergie,et qui ne se manifesterait que plus tardivement.

En somme la captation leucocytaire des iodothyronines serait due à l'intense capacité de fixation de T_4 par la TBP cellulaire, mais sa concentration finale serait régie par les mécanismes actifs de la perméabilité de la membrane.

Dans le cas des acides iodothyroacétiques l'influence de ce dernier phénomène paraît moins importante, ce qui explique que leur diffusion est plus rapide et leur captation plus élevée.

RÉSUMÉ

La fixation de la L-thyroxine (T_4) sur les protéines plasmatiques et la captation des hormones thyroïdiennes et de leurs dérivés acétiques par les leucocytes de cheval a fait l'objet de nos recherches, comportant deux parties.

Dans la première partie nous avons établi que T_4 est fixée à une protéine (TBP = thyroxine binding protein), migrant entre les α_1- et α_2-globulines et que la capacité de saturation atteint comme chez l'homme 10 µg de T_4/100 ml de plasma, soit sensiblement 0,00125 µg T_4/mg de protéine.

Dans les conditions adoptées de température (24°C) et de concentration protéique finale de 32 mg/ml, la TBP s'insolubilise entre 45 et 50 % de la saturation en sulfate d'ammonium (P_{45-50}). Les fractions moins solubles, qui renferment les γ- et β-globulines, ne lient pas T_4 , les fractions les plus solubles, renfermant les albumines, ne montrent pas de fixation de T_4 entre les α_1- et α_2-globulines. Des fractionnements du précipité protéique P_{45-50} entre des limites étroites de concentration saline ont permis d'individualiser avec certitude la TBP aux inter α-globulines et de la concentrer 60 fois par rapport au plasma initial. La capacité de fixation de T_4 par la

fraction protéique la plus enrichie en TBP est de l'ordre de 0,075 µg T_4/mg de protéine.

Dans la deuxième partie nous avons présenté une technique d'isolement des leucocytes à partir de sang de cheval hépariné, sans adjonction d'aucune autre substance. La préparation a consisté en une série de centrifugations différentielles, d'abord à la température du laboratoire, puis en des lavages à une température voisine de 0°C pour éliminer les hématies.

Les préparations leucocytaires renferment en général moins de 3 hématies par 100 leucocytes. La consommation d'oxygène des globules blancs en tampon phosphaté 0,2 M à pH 7,5 est de 32,2 à 91,5 micromoles O_2 par heure pour 10^{10} globules blancs.

La L-thyroxine (T_4), la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3), les acides 3,5,3'-triiodothyroacétique (TA_3) et 3,5,3',5'-tétraiodothyroacétique TA_4 sont captés par les leucocytes, ces derniers plus intensément et plus rapidement que les iodothyronines.

La captation des iodothyronines est moins sensible à l'action de la température que celle des acides tri- et tétraiodothyroacétiques. Mais elle est pour tous ces produits pratiquement indépendante de leur concentration. Avec T_4 et T_3 on observe un mécanisme biphasique de pénétration cellulaire. La première étape correspond vraisemblablement à un phénomène physique de diffusion, la seconde à un processus complexe, actif, lié à la perméabilité de la membrane cellulaire.

Les fractionnements subcellulaires des leucocytes ont permis d'une part de caractériser une protéine soluble qui, extraite des particules, est capable de fixer T_4.

La nature de cette TBP est différente de celle du plasma, car elle migre au niveau des Y-globulines. D'autre part l'étude sur la répartition de T_3 et de TA_3 dans les diverses fractions des leucocytes a montré que près de 30 % du premier sont retenus dans les granules, microsomes et protéines solubles, tandis que cette proportion dépasse 43 % dans le cas de TA_3. Ces deux expériences permettent de conclure que les dérivés iodés pénètrent à l'intérieur des globules blancs et ne sont pas simplement adsorbés sur leur membrane.

L'addition de quantités croissantes de sérum de cheval au milieu dans lequel sont incubés les leucocytes se traduit par une diminution progressive de la captation des iodothyronines et de leurs dérivés acétiques par les globules blancs. Malgré ce fait, on peut penser que la TBP leucocytaire est nettement plus puissante que la TBP plasmatique et que son seuil de saturation est plus élevé.

Dès lors, la captation leucocytaire des iodothyronines serait due à l'intense capacité de fixation de T_4 par la TBP cellulaire, mais la concentration finale serait régie par les mécanismes actifs de la perméabilité de la membrane.

Dans le cas des acides iodothyroacétiques, l'influence de ce dernier phénomène paraît moins importante, ce qui explique que leur diffusion est plus rapide et leur captation plus élevée.

B I B L I O G R A P H I E

1. ALEXANDER W.D., BISSET S.K. : Lancet 7059 ii, 1265 (1958).
2. ALEXANDER W.D., BISSET S.K. : Quarterly J.Exp.Phys. 46, 46 (1961).
3. ANNISON E.F., LEWIS D. : Biochem. J. 68, 29 (1958).
4. ASTWOOD E.B. : J. Clin. Endocrinol. 11, 1045 (1951).
5. BARAC G. : Clin. Chim. Acta 3, 99 (1958).
6. BENARD H., CRUZ A., MICHEL O., MICHEL R., ROCHE J., THIEBLEMONT P. : Ann. Endocrinol. 22, 429 (1961).
7. BENSOUR W., HERBERT H., QUIGLEY J. : Abstract Gynecology 17, 238-248 (1961).
8. BESKOW A. : C.R. Soc. Biol. 91, 1092 (1924).
9. BISSET S.K., ALEXANDER W.D. : Quarterly J. Exp. Phys. 46, 50 (1961).
10. CHARY R. : Le Sang 22, 307 (1952).
11. COHN E.J., STRONG L.E., HUGHES W.L., MULFORD D.J., ASHWORTH J.N., MELIN M., TAYLOR A.L. : J. Amer. Chem. Soc. 68, 459 (1946).
12. COHN Z.A., HIRSCH J.G. : J. Exp. Med. 112, 986-988 (1960).
13. COVELLI I. : C.R. Soc. Biol. 154, 1374 (1960).
14. CRISPELL K.R., COLEMAN J. : J. Clin. Invest. 35, 475 (1956).
15. CRISPELL K.R., COLEMAN J., HYER H.J. : J. Clin. Endocrin. 17, 1305 (1957).
16. DAUSSET J., NENNA A., BRECY H. : Blood 9, 696 (1954).
17. DOWLING J.T., FREINKEL N., INGBAR S.H. : J. Clin. Endocrin. 16, 280 (1956).
18. DOWLING J.T., FREINKEL N., INGBAR S.H. : J. Clin. Invest. 35, 1263 (1956).
19. FLECK L., LILLE - SZYSZKOWICZ I. : Le Sang 28, 589 (1957).
20. FLEISHER G.A. : Arch. of Bioch. 61, 119-127 (1956).
21. FLEURY P., COURTOIS J.E., EBERHARD : Ann. Biol. Clin. 10-11-12, 512 (1951).

22. FOLIN O., CIOCALTEU V. : J. Biol. Chemistry 73, 627 (1927)

23. FREINKEL N., INGBAR S.H., DOWLING J.T. : J. Clin. Invest. 34, 1698 (1955).

24. FREINKEL N., INGBAR S.H., DOWLING J.T. : J. Clin. Invest. 36, 25 (1957).

25. FREINKEL N., LEWIS D. : J. Physiol. 135, 288 (1957).

26. GLEISS J. : Ztschr. f. Kinderheilk. 66, 455 (1949).

27. GORDON A.H., GROSS J., O'CONNOR D., PITT - RIVERS R. : Nature, Lond. 169, 19 (1952).

28. GRAY S., MITCHELL E.B. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 51, 403 (1942).

29. HAMOLSKY M.W., FREEDBERG A.S. : Trans. Amer. Goiter-Ass. 269 (1954).

30. HAMOLSKY M.W., GOLODETZ A., FREEDBERG A.S. : J. Clin. Endocrinol. 19, 103 (1959).

31. HAMOLSKY M.W., STEIN M., FREEDBERG A.S. : J. Clin. Endocrin. 17, 33 (1957).

32. HARDWICKE J., RICKETTS C.R., SQUIRE J.R. : Nature 166, 988 (1950).

33. HARINGTON C.R., PITT-RIVERS R., QUERIDO A., ROCHE J., TAUROG A. : Nature 179, 218 (1957).

34. HOGNESS J.R., LEE N.D., BERG M.K., WILLIAMS R.H. : J. Clin. Invest. 36, 803 (1957).

35. HORST W., RÖSLER S.R. : Klin. Wschr. 31, 13 (1953).

36. INGBAR S.H. : Annals N.Y., Academy of Sciences 86, 440 (1960).

37. INGBAR S.H. : Endocrinology 63, 256 (1958).

38. INGBAR S.H., DOWLING J.T., FREINKEL N. : Endocrinology 61, 321 (1957).

39. LARSON F.C., DEISS W.P., ALBRIGHT E.C. : Science 115, 626 (1952).

40. LEIN A., DOWBEN R.M. : Amer. J. Physiol. 200, 1029 (1961).

41. LI J.G., OSWOOD E.E. : Blood 4, 670 (1949).

42. LIPNER H.J., BARKER S.B., WINNICK T. : Endocrinology 51, 406 (1952).

43. LISSITZKY S., ROQUES M., BÉNÉVENT M.T. : C.R. Soc. Biol., 153, 803-807 (1959).

44. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.L. : J. Biol. Chemistry 193, 265-275 (1951).

45. LYBECK H. : Acta Med. Scand. Suppl., 327 (1957).

46. MAUPIN B. : Rev. Hématologie 14, 250 (1959).

47. MAUPIN B. : Le Sang 21, 76 (1950).

48. MAURER W., MULLER E.R. : Biochem. Ztschr. 324, 325 (1953).

49. MAURER W., REICHENBACH L. : Naturwiss. 39, 261 (1952).

50. MICHEL R. : 18e Congr. Ass. Pédiatres Langue Franç., Genève 1, 1 (1961).

51. MOLONEY W.C. : Ann. N.Y. Acad. Sci. 75, 31 (1958).

52. MURPHY J.B., KIES M.W. : Biochim. Biophys. Acta 45, 382-384 (1960).

53. MYANT N.B., OSORIO C. : J. Physiol. 146, 344 (1959).

54. NEUHAUS O.W., SOGOIAN V. : J. Biol. Chem. 234, 821 (1959).

55. OSORIO C., MYANT N.B. : Nature, London 182, 866 (1958).

56. PETERMAN M.L., ROBBINS J., HAMILTON M.G. : J. Biol. Chem. 208, 369 (1954).

57. RIGGS D.S. : Pharmacol. Rev. 4, 284 (1952).

58. PITT-RIVERS R., TATA J.R. : The Thyroid Hormones, Perg. Press, 1959, London.

59. ROBBINS J. : Arch. Biochem. Biophys. 63, 461 (1956).

60. ROBBINS J., APTER R.A., RALL J.E. : Program of the Endocrine Soc. 39th Meeting 50 (1957).

61. ROBBINS J., PETERMAN M.L., RALL J.E. : J. Biol. Chem. 212, 403 (1955).

62. ROBBINS J., RALL J.E. : Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. 81, 530 (1952).

63. ROBBINS J., RALL J.E. : Recent Progress Hormone Res. 13, 161 (1957).

64. ROCHE J., MICHEL R., JOUAN P., WOLF W. : Bull. Soc. Chim. Biol. 37, 819 (1955).

65. ROCHE J., MICHEL R., KUNLIN J., THIEBLEMONT P., MICHEL O.: C.R. Soc. Biol. 153, 910 (1959).

66. ROCHE J. MICHEL R., MICHEL O., LISSITZKY S. : Biochim. Biophys. Acta 9, 161 (1952).

67. ROCHE J., MICHEL R., THIEBLEMONT P., MICHEL O., RICHARD S.: C.R. Soc. Biol. 153, 949 (1959).

68. ROCHE J., SALVATORE G., COVELLI I. : C.R. Soc. Biol. 153, 1116 (1959).

69. SALTER W.T. : Ann. N.Y. Acad. Sc. 50, 358 (1949).

70. SCHMID K. : J. Amer. Chem. Soc. 75, 60 (1953).

71. SCHMID K. : J. Amer. Chem. Soc. 75, 2532 (1953).

72. SCHULTZE H.E., SCHONENBERGER M., SCHWICK H. : Biochem.Z. 328, 267 (1956).

73. SHELLABARGER C.J., TATA J.R. : Endocrinology 68, 1056 (1961).

74. SINGER T.P., SILBERBACH I., SCHWARTZ S. : Blood 1, 88 (1947).

75. SPEER F. : Blood 9, 1055 (1948).

76. TATA J.R. : Biochim. Biophys. Acta 28, 91 (1958).

77. TATA J.R. : Biochem. J. 77, 214 (1960).

78. TATA J.R. : British Med. Bull. 16, 142 (1960).

79. TATA J.R. : Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 1171 (1960).

80. TATA J.R. : Clin. Chim. Acta 6, 819 (1961).

81. TATA J.R., SHELLABARGER C.J. : Biochem. J., 72, 608 (1959)

82. TAUROG A., CHAIKOFF I.L. : J. Biol. Chem. 171, 439 (1948).

83. TAUROG A., CHAIKOFF I.L. : J. Biol. Chem. 171, 639 (1948).

84. TONG W., TAUROG A., CHAIKOFF I.L. : J. Biol. Chem. 207, 59 (1954).

85. TULLIS J.L. : Blood 6, 772 (1951).

86. TURPIN R., ROCHE J., MICHEL R., SALABÈ G., CRUVEILLER J.: C.R. Soc. Biol. 155, 1897 (1961).

87. VALLEE B.L., HUGHES Jr W.L., GOIBSON J.G. : Blood 1, 82 (1947).

88. WARBURG O., CHRISTIAN W. : Biochem. J. 2, 310 (1941).

89. WASASTJERNA C. : Scand. J. Clin. Lab. Invest. 8, 14 (1956)

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

OBJET DU TRAVAIL 5

PREMIERE PARTIE : ENRICHISSEMENT DE LA TBP DU PLASMA DE CHEVAL 7

INTRODUCTION 7

I. MÉTHODES EXPÉRIMENTALES 10

1. Mesures de la radioactivité et autoradiographies 11
2. Préparation des hormones thyroïdiennes marquées par ^{131}I 11
3. Dosage des protéines 15
4. Protéinogrammes et électroautoradiogrammes 18

II. FRACTIONNEMENT DES PROTÉINES PLASMATIQUES DE CHEVAL 21

1. Séparation du plasma 21
2. Fractionnement du plasma 21
   A. Précipitation à 45 % 22
   B. Précipitation à 45-50 % 23
3. Fractionnements de P_{45-50} 24
   Résultats 27

Discussion 28

Pages

DEUXIEME PARTIE : CAPTATION DES HORMONES THYROÏDIENNES ET DE LEURS DÉRIVÉS ACÉTIQUES PAR LES LEUCOCYTES DE CHEVAL ... 31

INTRODUCTION ... 31

I. MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ... 33

1. Préparation de TA_3 et TA_4 marquées par ^{131}I ... 33
2. Siliconage de la verrerie ... 34
3. Numération des globules blancs ... 34

II. PRÉPARATION DES LEUCOCYTES ... 35

1. Isolement des leucocytes ... 36
2. Analyse des préparations leucocytaires ... 39
Discussion ... 40

III. CAPTATION DES IODOTHYRONINES ET DE L'ACIDE TRIIODOTHYROACÉTIQUE PAR LES LEUCOCYTES ... 42

Introduction ... 42
1. Pénétration des produits hormonaux en milieu isotonique phosphaté ... 43
A. Captation des produits iodés en présence de leucocytes intacts ... 43
a) Captation des divers produits iodés pour une concentration de $3,2 \times 10^{-9}$ M 43
Conditions expérimentales ... 43
Résultats ... 45
α) en fonction du temps ... 45
β) pour des températures différentes ... 46
γ) en fonction du nombre de lavages ... 47
Discussion ... 48

Pages

b) Captation en fonction de la concentration des produits iodés 49
Conditions expérimentales 49
Résultats 50
α) pour une température de 37°C : incubation pendant 5 minutes 50
β) pour une température de 0°C : incubation pendant 30 minutes 51
Discussion 51
B. Captation des produits iodés en présence de fragments leucocytaires 52
a) Distribution subcellulaire de T_3 et TA_3 52
Conditions expérimentales 53
Résultats 53
Discussion 54
b) Caractérisation d'une protéine leucocytaire fixant T_4 55
Conditions expérimentales 55
Résultats 56
Discussion 58
2. Pénétration des produits hormonaux en présence de quantités croissantes de sérum de cheval 58
Conditions expérimentales 58
Résultats 59
A. Captation des produits iodés en fonction de la quantité de protéines sériques 59
a) pour une température de 37°C, incubation pendant 5 minutes 59
b) pour une température de 0°C, incubation pendant 30 minutes 59

Pages

B. Captation des produits iodés en fonction de leur concentration pour des quantités définies de protéines plasmatiques comprises entre 0 et 1 mg/ml 59

a) pour une température de 37°C, incubation pendant 5 minutes 59

b) pour une température de 0°C, incubation pendant 30 minutes 59

Discussion 62

RÉSUMÉ 64

BIBLIOGRAPHIE 67

TABLE DES MATIERES 67

VU et APPROUVÉ :

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
G. VALETTE

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean ROCHE